

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-75856

(43) 公開日 平成11年(1999) 3 月23日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 14/47

C 1 2 N. 9/90

C 1 2 N 9/90

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願平9-251544

(22) 出願日 平成9年(1997) 9 月17日

(71) 出願人 596149475

鶴尾 隆

東京都世田谷区宮坂3-36-6

(71) 出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

(72) 発明者 鶴尾 隆

東京都世田谷区宮坂3-36-6

(72) 発明者 山根 和彦

東京都豊島区巣鴨1-26-12 宮館コーポ
203号

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 トポイソメラーゼ結合タンパク質

(57) 【要約】

【解決手段】 トポイソメラーゼIIに結合するタンパク質、そのタンパク質をコードする遺伝子、およびこのタンパク質とトポイソメラーゼIIとの結合を阻害する物質のスクリーニング方法を提供する。

【効果】 本発明の方法によれば、トポイソメラーゼII α および β の双方に結合する新規タンパク質であるTopBP1とTopBP2の遺伝子および遺伝子産物を得ることができる。また、TopBPとトポイソメラーゼIIとの結合を阻害する物質のスクリーニング方法が提供される。さらに、トポイソメラーゼ-TopBP複合体におけるトポイソメラーゼ活性阻害物質のスクリーニング方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項2】 以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項3】 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項4】 請求項3に記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項5】 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項6】 請求項5に記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項7】 配列番号3に記載のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項8】 トポイソメラーゼIIと前記トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する請求項3～7に記載のタンパク質とを、検体の存在下に反応させる工程と、前記トポイソメラーゼIIと前記トポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質との複合体の生成量を測定する工程とを備える、TopBPタンパク質とトポイソメラーゼIIの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法。

【請求項9】 トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する請求項3～7に記載のタンパク質と特異的な吸収スペクトルを有する化合物もしくは特異的な検出が可能な化合物とを、反応させる複合体形成工程と、タンパク質結合活性を有する担体を用いて前記複合体を過し、前記複合体と未結合の化合物とを分離する分離工程と、溶液中に存在する未結合の化合物を検出する検出工程とを備える、TopBPタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法。

【請求項10】 トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する請求項3～7に記載のタンパク質とトポイソメラ

ーゼIIと反応させる第一複合体形成工程と、前記第一複合体と特異的な吸収スペクトルを有する化合物もしくは特異的な検出が可能な化合物とを反応させる第二複合体形成工程と、タンパク質結合活性を有する担体を用いて前記第二複合体を過し、前記複合体と未結合の化合物とを分離する分離工程と、溶液中に存在する未結合の化合物を検出する検出工程とを備える、トポイソメラーゼII-TopBPタンパク質複合体に結合する化合物のスクリーニング方法。

【請求項11】 TopBPタンパク質とトポイソメラーゼIIと反応させる第一複合体形成工程と、前記第一複合体と化合物とを反応させる第二複合体形成工程と、前記第二複合体形成時におけるトポイソメラーゼIIの活性を検出する活性検出工程とを備える、トポイソメラーゼII-TopBPタンパク質複合体におけるトポイソメラーゼII活性を阻害する化合物のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、トポイソメラーゼ結合タンパク質(TopBP)に関する。より詳細には、ヒトトポイソメラーゼII結合タンパク質として新たに見出されたTopBP1およびTopBP2に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】DNAのトポロジカルな変化を触媒する酵素であるトポイソメラーゼには、トポイソメラーゼIとトポイソメラーゼIIとがあることが知られている。これらのうち、トポイソメラーゼIIには、異なる遺伝子から発現される、トポイソメラーゼII α およびトポイソメラーゼII β という2種類のタイプがあることが知られている。ヒトの遺伝子から発現された場合のこれらの分子量は、トポイソメラーゼII α が170kDa、トポイソメラーゼII β が180kDaである。N-末端で始まる、トポイソメラーゼII β セグメントの4分の3はトポイソメラーゼII α との相同性が高かったが、C-末端領域が異なり、この領域によって異なる細胞の機能、すなわち活性調節機構が存在することが示唆されている。

【0003】DNAトポイソメラーゼは、DNAのトポロジカルな変化を触媒する酵素であり、トポイソメラーゼIIは、DNA中における二本鎖の一時的な切断を生じさせ、そのままの(intact)DNAをこの切断部を通して移動させ、この切断部をライゲートするように作用する。そして、トポイソメラーゼIIは酵母における染色体の分離と複製とに必須であることが知られている(Watt, P. M., and Hickman, J. D., Biochem. J. 303:681-695(1994), およびWang, J. C., Annu. Rev. Biochem. 65:635-692(1996))。

【0004】このような作用を有するトポイソメラーゼは抗腫瘍剤との関連が深く、アドリマイシンおよびエトポシドなどの主要な抗腫瘍剤は、DNAのニック部位に

共有結合されたトポイソメラーゼの中間反応を安定化することが知られている(Liu, L. F. Annu. Rev. Biochem. 58:351-375(1989))。

【0005】このような開裂可能な複合体によって生じるDNAの損傷によって、プログラムされた腫瘍細胞の死を導くことができることは、Kaufman, S. H. (Kaufman, S. H., Cancer Res., 49:5870-5878(1989)) によつたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質であることを報告されている。

【0006】また、低酸素およびグルコース欠乏症などのストレス条件の下で自然に発生する固形腫瘍ではトポイソメラーゼIIの量が少ないことも知られており、このことにより、化学療法に対する固形腫瘍の耐性が、部分的には、トポイソメラーゼIIの量の減少によるものであることが示唆されている(Beck, W. T. とDanks, M. K. Oncol. Res. 2:235-244(1991), Yun, J., Tomida, Nagata K. とTsuruo, T. Oncol. Res. 7:583-590(1991))。

【0007】したがって、理論的には何らかの手段を用いてトポイソメラーゼIIの活性を調節することにより、腫瘍に対する化学療法の効果を高めることも可能である。しかし、トポイソメラーゼの活性を何らかの手段で調節するためには、トポイソメラーゼの活性の調節機構を解明し、このような調節機構に包含される因子を同定することが必要である。

【0008】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明の発明者らは、このような状況の下で、トポイソメラーゼの活性調節機構の解明を目的として鋭意研究を進めた結果、この調節機構に包含される因子であり、トポイソメラーゼIIβのC-末端領域に結合する新規なタンパク質を見出し、本発明を完成したものである。

【0009】すなわち、本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子であり、ここで(a)および(b)はそれぞれ、(a)配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質、である。

【0010】また、本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子であり、ここで、(a)および(b)はそれぞれ、(a)配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)アミノ酸配列(a)において1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質、である。

【0011】さらに、本発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質である。ここで、本発明のタンパク質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラー

ゼIIに結合する活性を有するタンパク質であることを特徴とする。

【0012】さらにまた、本発明は、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質である。ここで、本発明は、配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加され、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質であることを特徴とする。

【0013】本発明はまた、配列番号3に記載のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質である。

【0014】上記のアミノ酸の付加、欠失又は置換は出願前周知技術である部位特定変異誘発(例えば、Nucleic Acids Reserch, Vol.10 No.20, p6487~6500を参照のこと)により実施することができ、アミノ酸の付加、欠失又は置換に関し、1又は数個のアミノ酸とは、部位特定変異誘発法により付加、欠失又は置換できる程度のアミノ酸である。

【0015】さらに、本発明は、トポイソメラーゼIIと前記トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する配列番号1~3に記載のタンパク質またはこれらの配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、付加されたタンパク質(以下、変異タンパク質という)とを、検体の存在下に反応させる工程と、前記トポイソメラーゼIIと前記トポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質との複合体の生成量を測定する工程とを備える、TopBPタンパク質とトポイソメラーゼIIの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法である。

【0016】本発明は、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する上記のタンパク質または変異タンパク質と特異的な吸収スペクトルを有する化合物もしくは特異的な検出が可能な化合物とを、反応させる複合体形成工程と、タンパク質結合活性を有する担体を用いて前記複合体を濾過し、前記複合体と未結合の化合物とを分離する分離工程と、濾液中に存在する未結合の化合物を検出する検出工程とを備える、TopBPタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法である。

【0017】本発明はまた、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する上記のタンパク質または変異タンパク質とトポイソメラーゼIIと反応させる第一複合体形成工程と、前記第一複合体と特異的な吸収スペクトルを有する化合物もしくは特異的な検出が可能な化合物とを反応させる第二複合体形成工程と、タンパク質結合活性を有する担体を用いて前記第二複合体を濾過し、前記複合体と未結合の化合物とを分離する分離工程と、濾液中に存在する未結合の化合物を検出する検出工程とを備える、トポイソメラーゼII-TopBPタンパク質複合体に結合す

る化合物のスクリーニング方法である。

【0018】加えて、本発明は、TopBPタンパク質とトポイソメラーゼIIと反応させる第一複合体形成工程と、前記第一複合体と化合物とを反応させる第二複合体形成工程と、前記第二複合体形成時におけるトポイソメラーゼIIの活性を検出する活性検出工程とを備える、トポイソメラーゼII-TopBPタンパク質複合体におけるトポイソメラーゼII活性を阻害する化合物のスクリーニング方法である。

【0019】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳細に説明する。「(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子」とは、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であればよく、種々の動物に由来するもの、化学合成されたもの、および遺伝子工学的に産生されたタンパク質をコードする遺伝子を包含する。

【0020】「アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列をコードする遺伝子」とは、上記の配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1個以上、特に1もしくは数個のアミノ酸が欠失したもの、あるアミノ酸が他のアミノ酸と置換されたもの、もしくは上記のアミノ酸配列にアミノ酸が付加されたものをコードする遺伝子をいう。ここで、アミノ酸配列の欠失は、欠失が生じたタンパク質がトポイソメラーゼIIに結合する活性を有する限り、配列番号1のアミノ酸配列のいかなる部分に生じていてもよく、その数も限定されない。アミノ酸が置換された場合および付加された場合にも、置換もしくは付加が生じた後のタンパク質がトポイソメラーゼIIに結合する活性を有する限り、アミノ酸の置換、付加の数およびそれらが生じる位置は特に限定されない。

【0021】本発明において、TopBPとは「トポイソメラーゼに結合する活性を有するタンパク質」をいう。TopBPには、後述するように、TopBP1とTopBP2とが含まれる。「トポイソメラーゼに結合する活性」とは、トポイソメラーゼと何らかの相互作用が可能な形で結合する活性を意味し、例えば、水素結合などによって結合することができ活性をいう。

【0022】「トポイソメラーゼ」とは、DNAのトポロジカルな変化を触媒する酵素をいい、その由来は特に限定されない。すなわち、ヒトを始めとする哺乳類などの動物種を酵素源として得られたものであってもよく、トポイソメラーゼをコードする遺伝子を用いて、細胞によって遺伝子工学的に産生させたものであってもよい。

【0023】トポイソメラーゼが触媒する反応には、超らせんの変化および結び目や連鎖構造の形成が含まれ、DNAをトポロジカルに変換するためにはDNA鎖の一時的な切断と再結合とが必要であるため、I型およびII型のトポイソメラーゼによってこのようなDNAの変化が触媒さ

れる。

【0024】本発明においてトポイソメラーゼIIとは、上記のトポイソメラーゼの2つの型のうち、II型のものをいう。トポイソメラーゼIは二本鎖中の一本鎖に一時的に切断部を形成する。トポイソメラーゼIIは、DNA中における二本鎖を一時的に切断し、そのままの(intact) DNAをこの切断部を通して移動させ、この切断部をライゲートする。トポイソメラーゼIIをコードする遺伝子は、ヒトにおいては複数であり、異なる遺伝子から、トポイソメラーゼII α (170kDa) とトポイソメラーゼII β (180kDa) という2つのII型酵素が産生される。本発明においてTopBP1およびTopBP2が結合するタンパク質は、トポイソメラーゼIIである。

【0025】「トポイソメラーゼIIのC-末端領域」とは、トポイソメラーゼIIの3'側に存在する調節活性を有する領域を含む領域をいう。ヒトのトポイソメラーゼII β では、アミノ酸番号1143~1621で示される領域(配列番号6)をいい、ヒトのトポイソメラーゼII α ではアミノ酸配列番号1195~1531で示される領域をいう。

【0026】また、「(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子」とは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であればよく、上記同様、種々の動物に由来するもの、化学合成されたもの、および遺伝子工学的に産生されタンパク質をコードする遺伝子を包含する。

【0027】「(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子」とは、配列番号1と同様なアミノ酸の欠失、置換、付加などの変異が生じており、さらにトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をいう。このような変異は、アミノ酸配列に変異が生じたタンパク質がトポイソメラーゼIIに結合できる活性を有する限り、配列番号2のアミノ酸配列のいかなる部分に生じていてもよく、その数も特に限定されない。

【0028】さらに、本発明は、配列番号1~3のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質である。ここで、本発明のタンパク質は、上記配列番号1~3のいずれかに記載のアミノ酸配列において、上述のような1もしくは数個のアミノ酸の欠失、置換もしくは付加が生じていてもよい。好ましくは、上記配列番号1~3のいずれかに記載のタンパク質をコードする遺伝子である。図1に、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるTopBPを模式的に示す。図1にはさらに、AにヒトのトポイソメラーゼII β の構造を、BにヒトのTopBP1の構造を示してある。CにTopBP2の構造を示す。

【0029】トポイソメラーゼは、図1Aに示すように、5'側から、ATPase活性、DNA切断/再結合活性、調

節活性をそれぞれ有する領域からなる。これらの領域のうち、DNA切断/再結合活性を有する部分の3'末端側から調節活性を有する部分にかけての領域、すなわち、トポイソメラーゼII β のアミノ酸番号1143~1621に該当する領域(配列番号6)がTopBP1および2の結合活性を有する。また、アミノ酸番号1,143~1,272に該当する領域(配列番号7)はTopBP2結合活性を有する領域である。なお、トポイソメラーゼII α のアミノ酸配列1,115~1,249もTopBP1およびTopBP2との結合活性を有する領域である。

【0030】TopBP1は1,522アミノ酸からなる分子量170,670のタンパク質であり、アデノシルリボシル化活性および核局在化活性を有する領域と、8つの繰り返し領域を有する。図1Bにおいて、これら繰り返し領域を1~8の数字で示した。アデノシルリボシル化活性を有する領域の上流側、すなわちアミノ酸番号862~1521までに該当する領域がトポイソメラーゼII β 結合活性を有する。このタンパク質のアミノ酸配列と塩基配列とを配列番号3および5に示す。TopBP2は392アミノ酸からなる分子量44,336のタンパク質であり、いずれもinvitroで合成したトポイソメラーゼII β のC-末端領域と相互作用する。このタンパク質のアミノ酸配列と塩基配列とを配列番号1、2および4に示す。

【0031】TopBP1およびTopBP2についてBLAST(basic local alignment search tool)を用いてホモロジー検索地Aという)を用いて、形質転換体を選択する。陽性クローンを行った結果、TopBP1が、Rad4, Cut5, Ect2, Rev1およびXRCC1に含まれる領域に相同な8つの領域およびポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの自己修飾部位と相同な領域を有することが示され、TopBP2は概日時計調節因子(circadian clock regulated factor)であるノクツニン(nocturnin)に含まれる領域と相同性を有することが示される。

【0032】また、TopBP2においては、アミノ酸番号87~392(配列番号1)に該当する領域が、トポイソメラーゼII β 結合活性を有する。このような活性を有するタンパク質は、例えば、遺伝子工学的な手法により、以下のようにして単離、精製することができる。ヒトTopBP2に例をとって説明する。

【0033】まず、目的とするTopoII β の遺伝子の所定の領域を、通常の場合でPCRを行って増幅する。この増幅においては、鋳型として各種のcDNAを用いることができるが、ヒト腎から調製されたcDNAを使用する。プライマーとしては、例えば、配列番号8および9に記載の塩基配列を有するものを用いる。このときの増幅には、94℃、1分、55℃、1.5分、72℃3分を1サイクルとして30回行い、最後に72℃で10分反応させるといった条件が好適である。

【0034】このようにして得た増幅産物を、適当なプラスミドにクローニングしてベイトプラスミドを構築する。ベイトプラスミドとは、ツーハイブリッド法に用い

るプラスミドをいう。ベイトプラスミドの構築に使用するプラスミドとしては、pEG202を使用することができ、上記の増幅産物(TopoII β 遺伝子)をpEG202にクローニングしてpK835を作成する。

【0035】ついで、適当な系(システム)を用いて酵母を形質転換する。このような系としては、酵母のツーハイブリッドシステム(two-hybrid system)を使用することが、特定のタンパク質を取得することができるために好ましい。この系においては、酵母を増殖させ、リポーター遺伝子とベイトプラスミドとを用いて、標準的な条件で酵母を形質転換させる。この系で形質転換する酵母は、*S. cerevisiae* EGY48をはじめとして、各種の酵母を使用することができるが、*S. cerevisiae* EGY48を使用することが好ましい。リポーター遺伝子としては、pSH18-34、pSH18-8、pSH18-3などを使用することができるが、pSH18-34を使用することが好ましい。形質転換は、リチウム-ポリエチレングリコールを使って行うことが好ましい。

【0036】ついで、以上のようにして得られた形質転換体に、所定の細胞のcDNAライブラリーを導入する。導入するcDNAライブラリーとしては、HeLa細胞が使用できる。適当な条件、例えば、ロイシン不含、80mg/LのX-gal、2%のD-ガラクトース、6.7g/Lのyeast nitrogen base、0.6g/Lのdropout powderを含む培地(以下、合成培地)を用いて、形質転換体を選択する。陽性クローンをとり、トポイソメラーゼII β 結合活性を有する領域を含む陽性のcDNAクローン(pre)で再度これを形質転換してその表現型を確認する。再度形質転換を行うことにより、pK835-1のクローンを得ることができる。

【0037】このようにして、得られたクローンから産生されるタンパク質のトポイソメラーゼIIとの相互作用を調べ、アミノ酸配列を常法に従って決定する。アミノ酸配列は、ジデオキシ法もしくはマクサム-ギルバート法などによって決定することができる。

【0038】以上のようにして、図1に模式的に示すヒトのトポイソメラーゼII β とヒトのTopBP2を得ることができる。また、TopBP1もTopBP2と同様にして得ることができる。本発明のTopBP2とトポイソメラーゼIIとの結合を阻害する物質のスクリーニングは、下記のとおりである。

【0039】本発明のスクリーニング方法において使用する検体は、溶液に溶解または懸濁できるものであればよく、特に限定されない。例えば、有機、無機の各種の合成化合物、動植物から種々の方法を用いて得たタンパク質などの天然の化合物などを挙げることができる。より具体的には、ヒトの血液、リンパ液などの各種の体液や組織を検体として用いると、トポイソメラーゼIIの活性を指標として、細胞増殖活性を知ることができ、上記の組織の増殖が正常かどうかを確認することができるという利点がある。

【0040】本発明のスクリーニング方法においてトポイソメラーゼIIとトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質(TopoBP)との反応は、上記の検体を常法に従って通常のタンパク質の結合反応に用いられる溶液に溶解または懸濁液させ、通常酵素と他の物質の結合反応を行う温度範囲で行う。このような溶液としては、リン酸バッファー、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、ハンクスバッファー(HBSS)などの各種緩衝液を挙げることができる。また、上記の溶液と、例えば、ジメチルスルホキシド(DMSO)、エタノールなどの有機溶媒とを適宜混合して、反応溶液として用いてもよい。反応時間は、例えば、5~120分程度とすることが好ましい。

【0041】例えば、ウサギ網状赤血球ライセートシステム(Amersham)を用いて反応させる場合を例にとって、具体的に説明する。12.5倍濃縮の翻訳溶液(メチオニン不含)、2.5M酢酸カリウム2 μ L、25mM酢酸マグネシウム、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン(43TBq/mmol, 2.9MBq)4 μ L、2 μ g RNA、20 μ Lのウサギ網状赤血球ライセートを全体量50 μ Lになるように水を加え、30℃で60分間保温する。TopBP1もしくはTopBP2とグルタチオン(GST)との融合タンパク質を吸着させたグルタチオンセファロース(25 μ L)を20mM Tris-HCl(pH7.7)、100mM NaCl、1mM EDTA、0.5% NonidetP40で洗浄し、上記の翻訳溶液15 μ Lと検体の存在下に混合し、30分間氷上に置く。これを20mM Tris-HCl(pH7.7)、100mM NaCl、1mM EDTA、0.5% Nonidet P40で5回洗浄する。グルタチオンセファロース画分をポリアクリルアミド電気泳動し、吸着したトポイソメラーゼIIを検出することにより、TopII β に結合する活性を有するタンパク質の存在を確認することができる。

【0042】検体の存在下で生成されたトポイソメラーゼIIとTopoBPとの複合体は、例えば、以下のような方法で測定することができる。TopoBPを、 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{32}P などの放射性同位体、フルオレセインなどの蛍光化合物、その他の標識物質で標識し、トポイソメラーゼIIと結合していないTopBPを抗体などによって除き、複合体中の標識の活性を測定することにより、複合体の生成量を測定することができる。標識が放射性同位体の場合にはシンチレーションカウンターを用いて、また、蛍光物質の場合には蛍光検出器を用いてというように、標識の検出に適した検出器を使用すればよい。

【0043】また本発明のスクリーニング方法では、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する上記のタンパク質と特異的な吸収スペクトルを有する化合物もしくは特異的な検出が可能な化合物とを反応させて複合体を形成させ、ここで形成された複合体をタンパク質結合活性を有する担体を用いて濾過し、上記複合体と未結合の化合物とを分離し、濾液中に存在する未結合の化合物を検出することもできる。ここで使用する特異的な吸収スペ

クトルを有する化合物とは、分光光度計で検出することができる範囲に特異的な吸収スペクトルを有する化合物または蛍光を有する化合物をいい、例えば、アフラトキシンG1(Aflatoxin G1)、アドレノステロン(Adrenosterone)、フルオレセインなどを挙げることができる。

【0044】特異的な検出が可能な化合物とは、 ^1H 、 ^{13}C または ^{54}Cr などの放射性同位体を含む化合物、ビタミン・ホルモンなどの生理活性物質、その他特異的な反応でその存在を確認することができる物質などをいう。その他特異的な反応でその存在を確認することができる物質の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどを挙げることができる。

【0045】トポイソメラーゼIIと上記の化合物との結合は、約30~約37℃、好ましくは37℃前後で、通常酵素の反応に使用される上述のようなバッファー中で行うと、複合体が速やかに形成されるという利点がある。トポイソメラーゼIIと上記の化合物とが結合して生成された複合体は、タンパク質結合活性を有する担体を用いて未結合のトポイソメラーゼIIおよび上記化合物と分離する。

【0046】「タンパク質結合活性を有する担体」は、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する上記のタンパク質と特異的な吸収スペクトルを有する化合物とを反応させて形成した複合体を未結合体と分別できるものであればよく、特に限定されない。具体的には、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレンなどを挙げることができ、ニトロセルロースメンブレンを使用することがこれらを分離する上で好ましい。タンパク質結合活性を有する担体の形状は特に限定されないため、複合体を分離するにあたっては、上記のメンブレンを使用する他に、タンパク質結合活性を有する粒子状の担体を検体を含む反応溶液中に直接加える方法や、カラムに詰めてここに検体を含む反応溶液を通す方法など、各種の方法を採用することができる。

【0047】分離された未結合の化合物は、使用した化合物が特異的な吸収スペクトルを有する波長を用いて、UV検出器、蛍光検出器などを用いて検出する。例えば、このような化合物としてAflatoxin G1を用いた場合には362nm、Adrenosteroneを用いた場合には235nmで吸光度を測定することにより、反応溶液中のTopBPタンパク質に結合する物質を定量的または定性的に検出することができる。また、フルオレセインを用いた場合には、励起波長として493 nm、測定波長として510 nmを用いることにより、上記と同様に検出することができる。

【0048】また、トポイソメラーゼII-TopBPタンパク質複合体に結合する化合物は、以下のようにしてスクリーニングすることができる。まず、TopBPタンパク質とトポイソメラーゼとを反応させて第一複合体を形成させ、次にこの第一複合体と特異的な吸収スペクトルを有する化合物とを反応させて第二複合体を形成させ、タン

パク質結合活性を有する担体を用いてこの第二複合体を濾過し、複合体と未結合の化合物とを分離し、濾液中に存在する未結合の化合物を検出する。

【0049】TopBPとトポイソメラーゼとを結合させて第一複合体を形成させる条件は、上記の通りである。ついで、特異的な吸収スペクトルを有する化合物をこの第一複合体を含む反応溶液中に加えて、第一複合体を形成させる条件と同様の条件で反応させ、第二複合体を形成させる。ここで使用する特異的な吸収スペクトルを有する化合物は、上記の通りである。

【0050】ついで、第二複合体を、上記同様にタンパク質結合活性を有する担体を用いて未結合の化合物と分離する。分離した特異的な吸収スペクトルを有する化合物を、上述のようにして検出することにより、トポイソメラーゼ-TopBP複合体に結合する化合物をスクリーニングすることができる。

【0051】さらに、本発明のTopBPタンパク質を用いて、トポイソメラーゼ-TopBPタンパク質複合体におけるトポイソメラーゼ活性を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。すなわち、TopBPタンパク質とトポイソメラーゼとを反応させて第一複合体を形成させ、この第一複合体と化合物とを反応させて第二複合体を形成させ、ついで第二複合体の形成時におけるトポイソメラーゼの活性を検出することにより、トポイソメラーゼ-TopBPタンパク質複合体におけるトポイソメラーゼ活性を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。TopBPタンパク質とトポイソメラーゼとを反応させて第一複合体を形成させる条件、およびこの第一複合体と化合物とを反応させて第二複合体を形成させる条件は上記と同様である。

【0052】このスクリーニング方法において、第二複合体の形成時におけるトポイソメラーゼの活性の検出は、以下のようにして行う。すなわち、約30〜約37℃の温度、好ましくは、37℃前後で、上記のようなバッファーと適当な基質DNAとを用いて5〜120分間反応させ、反応生成物をアガロースゲル電気泳動で検出する。基質としては、スーパーコイル状DNAなどを挙げることができる。以上のようにして、トポイソメラーゼ-TopBPタンパク質複合体におけるトポイソメラーゼ活性を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。

【0053】上述のようにして得たTopBPタンパク質とトポイソメラーゼとの結合を阻害する化合物、TopBPタンパク質に結合するタンパク質、TopBPタンパク質-トポイソメラーゼ複合体に結合する化合物、およびTopBPタンパク質-トポイソメラーゼ複合体におけるトポイソメラーゼ活性を阻害する化合物は、トポイソメラーゼがDNAの複製に関与する酵素であることから、悪性腫瘍をはじめとする細胞の異常増殖を生ずる疾患の治療のための薬剤として使用することができる。

【0054】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1) TopBP1の単離および精製

(1) プラスミドの構築

ヒトトポイソメラーゼII β 遺伝子のC-末端領域をPCRで増幅した。鋳型としては、ヒト腎から調製されたcDNA(Quick-clone, Clontech)を使用した。プライマーとしては、配列番号8および9に記載の、5'-GGATCCGGTCAAAGA AAGATTTGATTCAAATG-3' (配列番号8)と、5'-GATTTGTTG AAAAATGTTTGTGCTC-3' (配列番号9)とを用いた。配列番号6に記載のトポイソメラーゼII β のアミノ酸残基1, 143-1,621に対応する領域を、pEG202のBamHI-XhoI部位にクローニングし、lexAを保持するpK835 (ベイト (bait) プラスミド) を構築した。

【0055】(2) 酵母のツーハイブリッドシステム (two-hybrid system)

この系は、ハーバード大学医学部のRoger Brent博士より贈られたものである。スクリーニングは、以下のように行った。リポーター遺伝子であるpSH18-34は、Roger Brent博士 (Harvard Medical School Boston, MA) から入手した (Jen Gyuris et al., Cell, 75:791-803 (1993))。

【0056】酵母としては、*S. cerevisiae* EGY48を、30℃にて、ヒスチジン不含(His⁻)、トリプトファン不含(Trp⁻)の合成A培地で終夜培養し、細胞を回収して洗浄した。ついで、OD₆₀₀が0.1になるように、2%グルコースを含有する新鮮な培地で希釈した。OD値を2時間ごとに測定しつつ、この酵母を増殖させた。標準的な方法に従って (Ausubelら、1987〜1993)、上記のように増殖させた*S. cerevisiae* EGY48を、上記のpSH18-34 (リポーター) と上記(1)で構築したpK835とで形質転換した。

【0057】ついで、HeLaのcDNAライブラリー (Jen Gyuris, et al., Cell, 75:791-803 (1993)、Roger Brent博士 (Harvard Medical School Boston, MA) より入手) を形質転換体に導入した。2%アガロースを含む合成培地A中、30℃で2日間培養した。2日後、レプリカにより、pSH18-34、pK835およびcDNAプラスミドを含む約10⁷個の独立のクローンを、ロイシン不含、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイル β -D-ガラクトピラノシド (X-gal) およびD-ガラクトースを含む培地上で、30℃で7日間増殖させた。

【0058】トポイソメラーゼII β 結合活性を有する領域を含む陽性のcDNAクローン (prey) で、pSH18-34とpK835とを有するEGY48 (以下、EGY48 (pSH18-34, pK835) という) を再度形質転換し、陽性の表現型を確認した。HeLa細胞の発現cDNAライブラリーから得られた β -ガラクトシダーゼ陽性クローン全体の約30% (9.6×10⁶個の独立のクローン) をさらに分析した。ただ1つのクローンが、生物学的に確認されたタンパク質-タンパク質相互

作用を示した。このクローン(図1B、prey)はトポイソメラーゼII β タンパク質のC-末端領域と同一であり、その機能は不明である(Nomura, EMBL:受託番号D87448)。このタンパク質をTopBP1と命名した(トポイソメラーゼII β 結合タンパク質)。

【0059】(3) DNA配列の決定

TopBP1のDNA配列は、Applied Biosystems社製のPrism プライマー(p55-18)

5'-GCTTCAAACGCCTTCTTCAGTCAGGAGGAGC-3' (配列番号10)

とAP1プライマーとを用いて、第1回のPCRを行った。これを鋳型として以下の配列を有するプライマー(p55-1

5'-TAATATAGCAGAAGCTGCTGCCCAGAACGTG-3' (配列番号11)

とAP2プライマーとを用いて第000のめのPCRを行った。

【0061】最も長いmRNAの5'末端を決定するために、以下の3種類の実験を行った。第一の実験には、HeLa細胞から予め作製されたcDNAによる5' RACE法(MarathoncDN

5'-AGGTGATCAAAGACAACGCCACTAAAAGGG-3' (配列番号12)

とAP1プライマーとを用いて、第1回のPCRを行った。これを鋳型として以下の配列を有するプライマー(p55-2

5'-TTCTGAACCTCGTTGGAGCCTCGGGGTCTCC-3' (配列番号13)

とAP2プライマーとを用いて第2回のめのPCRを行った。この方法によって確実に決定されたこの5'末端は、データベースの配列(EMBLD87448)中の配列とほぼ同一であったが、6塩基(5'-GGCGCC-3')短いものであった。

【0062】第二の実験では、1段階精製によって不安定なmRNAを調製し、タンパク質とRNA分解物質(degrader)を新鮮な細胞に直接添加することによって、HeLa細胞に対する過大なストレスを最小限にした(FastTrack, Invitrogen)。第三の実験では、胎盤由来のmRNAを使用した。第二の実験同様、このcDNAでもRACE分析においてより長い5'末端は得られなかった。

【0063】TopBP1の最大の転写物からの推定DNAおよびアミノ酸配列を図2Aに示した。mRNAが不安定であるためにmRNAの5'末端がさらに長いかもしれないという可能性は排除しきれていない。得られた15個のクローンについてTopBP1の3'領域を含むかどうか、およびそれらの制限パターンを検討した。制限パターンの検討に使用した制限酵素は、EcoRIである。TopBP1の3'-領域から単離された5個のクローンは同じ制限パターンを示した。他の10個のクローンには3'領域に関連する遺伝子が含まれていなかった。

【0064】もとのクローンと同一の3'領域は、検討した15個のクローンでは認められなかった。3' RACE法の結果をも勘案して、もとのクローンの3'領域はマイナーなケースかまたは人工的に生じたものであると考えられた。もとのクローンには3'非翻訳末端にmRNA不安定化モチーフないことが明らかになり、これによってmRNAの安定化とツーハイブリッドシステムによるクローンの検出ができることが示された。12セットのmRNA不安定化モチーフと2つの推定核局在化シグナルとを含む最も長い転写物は、1,522 アミノ酸残基をコードしていた(分子量

10シーケンサーを用いて決定した。TopBP1遺伝子の3'-領域については、Marathon-ready cDNAキット(Clontech社製)を用いてDNA端の3'-RACE(the 3'-rapid amplification on cDNA ends)法によって決定した。

【0060】すなわち、キットに付属のHeLa細胞由来の鋳型cDNAを使用し、下記の配列を有する遺伝子特異的な

9)

A, Clontech)を使用した。キットに付属のHeLa細胞由来の鋳型cDNAを使用し、下記の配列を有する遺伝子特異的なプライマー(p55-16)

0)

170,670)。

【0065】(4) TopBP1の配列と他のタンパク質の配列との比較

基本的ローカルアライメント検索ツール(basic local alignment search tool, BLAST, Stephen F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-4140(1990))を用いて、TopBP1の配列を他のタンパク質の配列とデータベースで比較した。

【0066】結果を図3に示す。図3Aには、示されたタンパク質とTopBP1とのアミノ酸残基とのアライメントを示す。図3A中、=は疎水性の残基を、&は親水性残基(S/TもしくはK/R/HもしくはE/DまたはN/Q)をそれぞれ示す。コンセンサス配列は、塩基が同一または50%以上類似している場合に、影をつけて示した。

【0067】図3Bには、TopBP1、Rad4/Cut5、Rev1、Ect2およびXRCC1を模式的に示した。斜線を付した枠内の数字は、図3Aに列挙した各タンパク質に付されたカッコ内の数字に対応するものである。枠内のタンパク質を構成するアミノ酸残基の総数を、各タンパク質を示す枠の右側に示した。Rev1はDNA修復タンパク質であるUmuCと類似の領域を含み、Ect2は小さなGTP-結合タンパク質のGTP-交換因子に類似の領域を含む。

【0068】図3Aおよび3Bで示したように、TopBP1は損傷されたDNA鎖の修復に関与する幾つかのタンパク質、具体的には、Rev1、Rad4/Cut5、XRCC1、およびEct2といったタンパク質中の特定の領域と相同性を有することが明らかになった。ここで、Rev1は、DNA修復機能を有し、化学物質に対する正常な「変異の誘導」に関与する。Rad4タンパク質は紫外線および放射線によって損傷されたDNAを修復する機能を有し、S-期の完了前にS期

の開始とM期の抑制にとって必要とされるCut5と同一である(Saka, Y., and Yanagida, M., Cell 74:383- (1993))。XRCC1タンパク質は電離放射線およびアルキル化剤で処理された鎖の切断の修復に関与する。Ect2は、GTPase活性化酵素の機能を有し、細胞の形質転換に関与する。

【0069】TopBP1はRad4タンパク質の第1および第2領域と相同な8個の繰り返し領域(第1~第8領域)を有していた。TopBP1の第1および第2領域はまた、XRCC1タンパク質の第一領域と相同性を有していた。以上のような相同性の検討から、トポイソメラーゼIIはその触媒反応の間、DNAを一時的に切断し、TopBP1がDNA鎖の修復に関与する可能性をも有することが示唆された。TopBP1は、トポイソメラーゼIIの触媒反応をサポートするシャペロンのように機能するかもしれない。

【0070】Rev1タンパク質はバクテリアのUmuC DNA修復タンパク質を含み、第1領域中でGly-193がArgに変化するRev1の突然変異は試薬による突然変異を誘導する。Gly-193は保存されたGly残基(図3A)に対応する。Ect2プロトオンコジンのN-末端領域は、トランスフォーム活性に対して負の効果を有することが示された。Ect2は、低分子型GTP結合タンパク質のGTP-変換因子に類似の領域を含む。

【0071】図3Cに示された領域は、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)の自己(ADP-リボシル)化部位に相同であり、ポリ(ADP-リボシル)化によって種々の核タンパク質を修飾し、DNAの修復を調節する。こうして、TopBP1はポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)の考えられる基質であり得る。加えて、この領域はPARPのジンクフィンガーモチーフを含まないが、DNA結合ドメイン中に短い相同体が表れた。

【0072】Rad4はCut5と同じであり、S期の開始とS期の完了前のM期の抑制の前に必要であることが示されており、THLIアミノ酸配列を含むXRCC1の第一領域がRad4の領域で複製されることが報告されている。TopBP1は8個の相同領域を有する(図3Aおよび3B)。Ect2プロトオンコジンのN-末端領域のトランケーションはそのトランスフォーミング活性を誘導する。切出されたCut5/Rad4の第一領域はモチーフに入るときに負の効果を与えることを示され、このことは、TopBP1が細胞周期を調節していることを示唆した。Rev1タンパク質はバクテリアのUmuC DNA複製タンパク質と相同な領域を含む。第一領域におけるRev1タンパク質の突然変異(Gly-193からArgへ)は試薬によって誘導されるものである。Gly-193は保存されたGly残基に相当する(図3A)。

【0073】Cut5の局在化は、*S. pombe*におけるトポイソメラーゼIIタンパク質のそれに類似する。このことは、TopBP1がトポイソメラーゼと相互作用するという結果に関連する。Cut5の切出された第一領域はG2期で細胞周期をブロックすることが示された。TopBP1の増加して

いる繰り返し領域および発癌性領域の欠落という特徴は、Ect2プロトオンコジンよりもCut5により類似しており、このことはTopBP1が複製のチェックポイントで正の調節を行い、M期のキナーゼの活性化で負の調節を行っていることを示した。繰り返し領域は共通タンパク質に結合し、これらの機能を発現させることができる。

【0074】TopBP1の他の領域は、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの自己(ADP-リボシル)化部位に相同であり、ポリ(ADP-リボシル)化によって種々の核タンパク質を修飾し、DNAの修復を調節する。こうして、TopBP1は、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)の考えられる基質となり得るため、DNAの修復に関与することが示唆されている。

【0075】TopBP1のmRNAは12個のAUUUAモチーフを有し、mRNA上での不安定性を付与する。ノーザンブロット分析により、一貫して、mRNAの特別な不安定性を有する、TopBP1転写物のテーリングパターンが示された。TopBP1のmRNAは非常に不安定であり、このことはmRNAの1段階精製を注意深く行う間に新鮮なHeLa細胞にタンパク質とRNase分解剤を直接加えたときに、他のノーザンブロット分析で同様なテーリングパターンが示されたことによる(データは示していない)。

【0076】(5)融合タンパク質の産生
ライブラリー中で陽性のシグナルを与えるpK835-1のcDNA領域を、pGEX-5X-1(ファルマシア社製)のEcoRI-XhoI部位にクローニングし、pK835-55Gを構築した。グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質を産生させるために、*E. coli* JM83を0.34mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)の存在下にLブロス中で、37℃にて3時間培養した。ついで、回収した細胞を、10mgのフェニルメタンスルフォネートフロリドを含む10mMのライシスバッファー(10mMのトリス-HCl(pH7.7)、0.5MのNaCl)中でソニケートした。遠心後、溶解物(0.1~1.5mL)をグルタチオンセファロースビーズ(50%スラリーの20μL、Pharmacia)とともにインキュベートした。ついで、ビーズを溶解バッファーで3回洗浄した。5μLの5mMのグルタチオン(GSH)、10mMのトリス-HCl(pH7.7)をこのビーズに添加し、5分間インキュベートした。10μLのゲルローディングバッファーを直接サンプルに添加し、そして3分間沸騰させた。ついで、タンパク質を5~20%のグラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。

【0077】(6)in vitroアッセイ
ヒトトポイソメラーゼIIβ遺伝子のEcoRI(部分精製した)-XhoI断片のC-末端領域を、cap非依存性翻訳エンハンサー(translational enhancer)を保持する、pCITE-2a(+)(Novagen社製)のEcoRI-XhoI部位にクローニングし、pK853を構築した。in vitroの転写は、標的遺伝子の3'末端遺伝子をXhoIで直鎖化したpK853を用いて、製造元(Promega社製)の使用説明書に従い、T7 RNAポリ

メラゼで行った。In vitroの翻訳は、レティキュロサイトライセートシステム (reticulocyte lysate system, Amersham社製) にて、 ^{35}S メチオニン (43TBq/mmol, 2.9MBq) の存在下に、2 μL の転写されたRNAを用いて、最終容量50 μL で行った。ビーズ上に固定された融合タンパク質を、洗浄バッファー (20mM トリス-HCl (pH 7.7), 100mM のNaCl, 1mM のEDTA, 0.5% のNonidet P4) で洗浄し、翻訳された産物と混合した。混合物を氷上で30分間インキュベートし、ついで、5回、洗浄バッファーで洗浄した。固定されたタンパク質の溶出は上記のとおりに行った。

【0078】(7) ノーザンブロット分析
マルチプライムDNAシステム (Amersham) を用いて、 ^{32}P 標識プローブを調製し、複数の組織のノーザンメンブラン (Clontech) に直接添加し、製造元の使用説明書に従って洗浄した。メンブランをFUJIX BAS 2000イメージアナライザーで分析した。

【0079】ノーザンブロット分析により、アクチン転写物 (図4B) とは対照的なTopBP2転写物のテーリングパターンが示された (図4B)。TopBP2のmRNAは、mRNA上での不安定性を供与し、mRNAが分解することを示す。12セットのAUUUAモチーフ (図2A) を含む。さらに、より短いmRNAは別のスプライシングによって産生される。TopBP1のmRNAは強いストレスによって分解され、ヒトの組織から調製される。グルコースの枯渇と低酸素症を含むこのようなストレスは、固形腫瘍中におけるトポイソメラーゼIIの減少を生じさせ、このことは、他の分子と相互作用している2つの分子が、共通のストレス感受性の特徴をもっていることを示す。TopBP1関連転写物は、異なるレベルで試験した成人ヒトの組織の多くの部分に偏在し、心臓、脳、胎盤、肺および肝で比較的豊富である (図4A)。より大きな転写物 (>10キロベース) が心臓で観察された。他の組織における最大の転写物は、4.4~5.5kbであり、RACE法によって決定されたHeLa細胞における最大の転写物 (5.3kb) のサイズと一致した。

【0080】(8) TopBP1のin vitroでのトポイソメラーゼII β との相互作用の検討
生物学的な相互作用を確認するために、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) -TopBP1融合タンパク質をE. coli 中で合成させ、グルタチオンセファロースビーズで精製した。このビーズから溶出したタンパク質を図5Aに示す。トポイソメラーゼII β のC-末端領域をウサギの網状赤血球溶解系を用いてin vitroで合成した。このビーズを洗浄し、ついで会合タンパク質を分析した (図5B)。トポイソメラーゼII β のC-末端領域は、TopBP1と特異的に相互作用した (レーン2)。

【0081】トポイソメラーゼII β のC-末端領域は、TopBP1と特異的に相互作用する。結合効率は低い (0.042%) が、この傾向はTopBP1および別のトポイソメラーゼI

I結合タンパク質であるSgs1 (Watt, P.M., Louis, E. J., Borts, R.H., and Hickson, I.D. (1995) Cell 81: 53-260) においても観察された。他方で、ツーハイブリッドシステムは強い陽性シグナルを与え、このことは、リン酸化などの翻訳後修飾が2つの分子の強い相互作用のために必要とされ得ることを示唆した。このアイデアもまた、in vitroにおける結合がE. coli 中で合成されたトポイソメラーゼII β のC-末端領域上で観察されないという証拠によって支持される。

【0082】ウェルナー症候群の遺伝子およびブルーム症候群の遺伝子はDNAヘリカーゼを、一部分コードしていることが明らかになった (Kurosaki, T., et al., J. Biol. Chem. 262: 15990-15997 (1987) and Lehmann, A. R. Nucleic Acids Res. 21 (1993))。これは、世界的に耳目を集めることとなった。酵母のトポイソメラーゼII結合タンパク質であるSgs1もまたDNAヘリカーゼであり (Watt, P.M., et al., Cell 81: 253-260 (1995))、そのため、トポイソメラーゼIIとそれに相互作用するタンパク質は、基本的な生物学的現象およびヒトの疾病において重要な役割を果たすことができる。TopBP1はヘリカーゼとは異なるため、残っているクローンをさらに分析し、トポイソメラーゼII結合タンパク質を系統立てて研究することが必要である。最後に、TopBP1は抗腫瘍剤の新規な分子標的となるはずであり、トポイソメラーゼIIと協同して作用することができることから判断される。

【0083】(実施例2) TopBP2の単離および精製
TopBP2の単離には、実施例1で使用したプラスミドと同様のものを使用した。

(1) 酵母のツーハイブリッドシステム (two-hybrid system)

HeLaのcDNA発現ライブラリーを、pSH18-34 (リポーター) とpK835 (バイト) とを用いて形質転換したEGY48中に導入した。2日後、pSH18-34、pK835およびcDNAプラスミドとを含む約107個の独立のクローンを、ロイシン不含、5-ブromo-4-クロロ-3-インドイル β -D-ガラクトピラノシド (X-gal) およびD-ガラクトースを含む培地上で増殖させた。

【0084】ヒトトポイソメラーゼII β のC-末端領域と相互作用するタンパク質を検出するために (図1A)、R. Brent博士および彼の同僚達によって改良されたツーハイブリッドシステムを用いた。HeLa細胞発現cDNAライブラリーからの総 β -ガラクトシダーゼ陽性クローンの約30% (9.6×10^6 個の独立のクローン) をさらに分析した。最初に、TopBP1断片 (図1B) が生物学的に確認されたタンパク質-タンパク質相互作用を示した。我々は、in vitroにおける結合アッセイ中でGST融合体のタンパク質濃度を高めようとした (5倍)。この手順によって、新たな融合タンパク質がin vitroでタンパク質-タンパク質相互作用を示した。トポイソメラーゼII β 結合タンパク質2についてタンパク質TopBP2と命名した

(図1C)。合計60個のクローン中には、TopBP2の制限パターンに類似する制限パターンを有する4個のクローンがあった。TopBP2に結合するトポイソメラーゼII β の領域は、ツーハイブリッド分析(A)によって、1,143~1,272残基(配列番号7)に狭められた。

【0085】(2) DNAの配列決定

DNAの配列は、Applied Biosystems社製のPrism 310シーケンサーを用いて行った。TopBP2遺伝子の5'領域を、5' RACE (the 5'-rapid amplification on cDNA ends (Clontech, Marathon-ready cDNA) によって決定した。多数のクローンの5'領域は、一貫して同じであった。TopBP2のcDNAの5'末端もまた、RACE法によって決定した。TopBP2の最大の転写物から得た推定アミノ酸配列を図2に示す。この転写物は、5セットのmRNA不安定化モチーフを含んでおり、推定の核局在化シグナルを有する、392アミノ酸残基(分子量44,336)をコードしていた。

【0086】(3) 融合タンパク質の産生

ライブラリー中で陽性のシグナルを与えるpK835-1のcDNA領域を、pGEX-5X-1(ファルマシア社製)のEcoRI-XhoI部位にクローニングし、pK835-1B1を構築した。グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質を産生させるために、pK835-1B1を保持するE.coli JM83を0.34mMのイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)の存在下にLブロス中で、37°Cにて3時間培養した。ついで、回収した細胞を10mMのライシスバッファー(10mMのトリス-HCl(pH7.7)、0.5MのNaCl)中でソニケートした。遠心後、溶解物(0.1~1.5mL)をグルタチオンセファロースビーズとともにインキュベートした。5 μ Lの5mMのグルタチオン(GSH)、10mMのトリス-HCl(pH7.7)をこのビーズに添加し、5分間インキュベートした。10 μ Lのゲルローディングバッファーを直接サンプルに添加し、そして3分間沸騰させた。ついで、タンパク質を5~20%のグラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。

【0087】(4) in vitroアッセイ

ヒトトポイソメラーゼII β 遺伝子のEcoRI(部分精製した)-XhoI断片のC-末端領域を、cap independent translational enhancerを保持する、pCITE-2a(+)(Novagertの組織から調製される、非常に強いストレスによって分解される。グルコースの枯渇と低酸素症を含むこのようなストレスは固形腫瘍中におけるトポイソメラーゼIIの減少を生じさせ、このことは、他の分子と相互作用している2つの分子が、共通のストレス感受性の特徴をもっていることを示す。TopBP2関連転写物は、成人ヒトでは、心臓、胎盤、肺および肝で比較的豊富である(図4A)。大きな転写物(>10キロベース)が心臓で観察された。

【0092】TopBP2のmRNAは5セットのAUUUAモチーフを有し、mRNA上での不安定性を付与する。ノーザンブロット分析により、一貫して、mRNAの特別な不安定性を有

た。混合物を氷上で30分間インキュベートし、ついで、6回、洗浄バッファーで洗浄した。7 μ Lのゲルローディングバッファーを直接にサンプルに添加し、3分間沸騰させた。

【0088】(5) TopBP2の配列の類似性の検討

基本的ローカルアライメント検索ツール(basic local alignment search tool, BLAST)を用いて、データベースで、TopBP2配列を他のタンパク質と比較した。図3Aに示すように、TopBP2は概日時計制御因子(circadian clock-regulated factor)であるnocturninの領域と相同な領域を有する。nocturninの機能は同定されていないが、タンパク質-タンパク質相互作用を介して機能できる転写因子であることが示唆されている。

【0089】TopBP2は、ヒトアデノウイルスのDNA末端タンパク質の領域と相同な領域を有する。末端タンパク質はDNAを複製する末端に共有結合で接着しており、ウイルスDNAの複製において何らかの役割を果たしているかもしれない。興味深いことに、トポイソメラーゼIIもまたDNAのニック部位と共有結合でつながれた中間体を形成する。

【0090】TopBP1はRad4/Cut5、XRCC1タンパク質と相同な8つの繰り返し領域を有し、紫外線および電離放射線の照射によるDNAの傷害を修復する。興味深いことに、トポイソメラーゼIIもまた、触媒反応の間、DNAにおいて一過性の傷害をつくる。TopBP1はトポイソメラーゼIIの触媒反応の失敗によって生じるDNA鎖の修復に関与し得ることが期待される。Cut5タンパク質の研究によって、TopBP1が複製のチェックポイントを正の方向に制御し、M期のキナーゼの活性化を負の方向に制御できることを示唆した。8つの繰り返し領域は、共通のタンパク質に結合してこれらの機能を発現することができる。

【0091】(6) ノーザンブロット分析

ノーザンブロット分析により、アクチン転写物とは対照的なTopBP2転写物のテーリングパターンが示された(図4A)。TopBP2のmRNAは、mRNA上での不安定性を付与し、mRNAが分解することを示す、5セットのAUUUAモチーフを含む。さらに、mRNAは別のスプライシングによって産生される。TopBP2のmRNAは一定の時間の経過後にヒトの組織から調製される、非常に強いストレスによって分解される。グルコースの枯渇と低酸素症を含むこのようなストレスは固形腫瘍中におけるトポイソメラーゼIIの減少を生じさせ、このことは、他の分子と相互作用している2つの分子が、共通のストレス感受性の特徴をもっていることを示す。TopBP2関連転写物は、成人ヒトでは、心臓、胎盤、肺および肝で比較的豊富である(図4A)。大きな転写物(>10キロベース)が心臓で観察された。

【0092】TopBP2のmRNAは5セットのAUUUAモチーフを有し、mRNA上での不安定性を付与する。ノーザンブロット分析により、一貫して、mRNAの特別な不安定性を有

する、TopBP2転写物のテーリングパターンが示された。このモチーフは、しばしば、重要なガン遺伝子およびサイトカインのmRNA中で観察された。TopBP1タンパク質とTopBP2タンパク質の量は厳密に制御されていると考えられる。

【0093】(7)TopBP2はin vitroでトポイソメラーゼIIβと相互作用する

生物学的な相互作用を確認するために、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)-TopBP2融合タンパク質をE. coli中で合成させ、グルタチオンセファロースビーズで精製した。このビーズから溶出したタンパク質を図5Aに示す。トポイソメラーゼIIβのC-末端領域をウサギの網状赤血球溶解液系を用いてin vitroで合成した。このビーズを洗浄し、ついで会合タンパク質を分析した(図5B)。

【0094】トポイソメラーゼIIβのC-末端領域は、TopBP2と特異的に相互作用する。結合効率は低い(0.6%)が、この傾向もまたTopBP1および別のトポイソメラーゼII結合タンパク質であるSgs1において観察された。他方で、ツーハイブリッドシステムは強い陽性シグナルを与え、このことは、リン酸化などの翻訳後修飾が2つの分子の強い相互作用のために必要とされ得る。このアイデアもまた、in vitroにおける結合がE. coli中で合成されたトポイソメラーゼIIβのC-末端領域上で観察されないという証拠によって支持される。

【0095】複数のTopBPがトポイソメラーゼIIの活性を変化させるかどうかについて試験した。細菌中で発現されたTopBPは、DrosophilaからのトポイソメラーゼIIのリラクゼーション活性を変化させなかった。現在、ヒトトポイソメラーゼIIβの精製を進めている。

【0096】ウェルナー症候群の遺伝子およびブルーム症候群の遺伝子はDNAヘリカーゼを、一部分コードしていることが明らかになったことは、世界的に耳目を集めることとなった。酵母のトポイソメラーゼII結合タンパク質であるSgs1もまたDNAヘリカーゼであり、そのため、トポイソメラーゼIIとそれに相互作用するタンパク質は、基本的な生物学的現象およびヒトの疾病において重要な役割を果たすことができる。

配列

Ala	Leu	Asn	Ser	Tyr	Phe	Glu	Pro	Pro	Val	Glu	Glu	Ser	Ala	Leu	Glu
1				5					10					15	
Arg	Arg	Pro	Glu	Thr	Ile	Ser	Glu	Pro	Lys	Thr	Tyr	Val	Asp	Leu	Thr
			20						25				30		
Asn	Glu	Glu	Thr	Thr	Asp	Ser	Thr	Thr	Ser	Lys	Ile	Ser	Pro	Ser	Glu
			35					40				45			
Asp	Thr	Gln	Gln	Glu	Asn	Gly	Ser	Met	Phe	Ser	Leu	Ile	Thr	Trp	Asn
			50			55					60				
Ile	Asp	Gly	Leu	Asp	Leu	Asn	Asn	Leu	Ser	Glu	Arg	Ala	Arg	Gly	Val
65					70					75				80	
Cys	Ser	Tyr	Leu	Ala	Leu	Tyr	Ser	Pro	Asp	Val	Ile	Phe	Leu	Gln	Glu

【0097】TopBP1とTopBP2とはヘリカーゼとは異なるため、残っているクローンをさらに分析し、トポイソメラーゼII結合タンパク質をシステムチックに研究した。近年、有糸分裂におけるクロマチドの分離がbarren産物に必要であることが示され、この産物はDrosophilaにおけるトポイソメラーゼIIと相互作用する。barrenはヒトの相同体を有する新規なタンパク質をコードするが、TopBP1およびTopBP2とは異なる。最後に、複数のTopBPは抗腫瘍剤の新規な分子標的となるはずであり、トポイソメラーゼIIと協同して作用することができることから判断される。トポイソメラーゼIIβのC-末端領域は、TopBP2と特異的に相互作用した(レーン2)。

【0098】以上より、DNAトポイソメラーゼIIβは偏在する分子であり、酵母において複製と染色体の分離のために必須であることが知られている。しかしながら、トポイソメラーゼIIの制御機構はほとんど理解されていない。そこで、新規なヒトトポイソメラーゼII結合タンパク質、TopBP2を同定した。TopBP2は、DNAの切断/再結合領域と制御領域との間に結合する(図1A)。TopBP2の機能は、さらに調査すべき部分が残っている。

【0099】

【発明の効果】本発明の方法によれば、トポイソメラーゼIIαおよびβの双方に結合する新規タンパク質であるTopBP1とTopBP2の遺伝子および遺伝子産物を得ることができる。また、TopBPとトポイソメラーゼIIとの結合を阻害する物質のスクリーニング方法が提供される。さらに、トポイソメラーゼ-TopBP複合体におけるトポイソメラーゼ活性阻害物質のスクリーニング方法が提供される。TopBPは細胞における遺伝子の複製、細胞増殖に関与している可能性があることから、抗癌剤の標的分子とすることができる。

【0100】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：306

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

				85				90						95			
Val	Ile	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Lys	Lys	Arg	Ser	Ser	Asn	Tyr		
			100					105					110				
Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	His	Glu	Glu	Gly	Tyr	Phe	Thr	Ala	Ile	Met	Leu		
		115						120				125					
Lys	Lys	Ser	Arg	Val	Lys	Leu	Lys	Ser	Gln	Glu	Ile	Ile	Pro	Phe	Pro		
		130				135					140						
Ser	Thr	Lys	Met	Met	Arg	Asn	Leu	Leu	Cys	Val	His	Val	Asn	Val	Ser		
145					150				155						160		
Gly	Asn	Glu	Leu	Cys	Leu	Met	Thr	Ser	His	Leu	Glu	Ser	Thr	Arg	Gly		
				165				170						175			
His	Ala	Ala	Glu	Arg	Met	Asn	Gln	Leu	Lys	Met	Val	Leu	Lys	Lys	Met		
			180					185					190				
Gln	Glu	Ala	Pro	Glu	Ser	Ala	Thr	Val	Ile	Phe	Ala	Gly	Asp	Thr	Asn		
		195					200					205					
Leu	Arg	Asp	Arg	Glu	Val	Thr	Arg	Cys	Gly	Gly	Leu	Pro	Asn	Asn	Ile		
	210					215					220						
Val	Asp	Val	Trp	Glu	Phe	Leu	Gly	Lys	Pro	Lys	His	Cys	Gln	Tyr	Thr		
225					230				235						240		
Trp	Asp	Thr	Gln	Met	Asn	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Lys		
				245				250						255			
Leu	Arg	Phe	Asp	Arg	Ile	Phe	Phe	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Glu	Gly	His		
			260			265							270				
Ile	Ile	Pro	Arg	Ser	Leu	Asp	Leu	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Leu	Asp	Cys		
		275				280						285					
Gly	Arg	Phe	Pro	Ser	Asp	His	Trp	Gly	Leu	Leu	Cys	Asn	Leu	Asp	Ile		
	290					295					300						
Ile	Leu																
305	306																

【0101】配列番号：2

配列の長さ：392

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列

Met	Arg	Glu	Arg	His	Asp	Thr	Gly	Ala	Cys	Ala	Glu	Pro	Arg	Val	Gly		
1				5					10					15			
Leu	Leu	Phe	Arg	Leu	Lys	Gly	Arg	Cys	Arg	Gly	Gly	Arg	Lys	Met	Glu		
			20					25					30				
Leu	Gly	Ser	Cys	Leu	Glu	Gly	Gly	Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Gly		
		35				40						45					
Glu	Pro	Glu	Val	Lys	Lys	Arg	Arg	Leu	Leu	Cys	Val	Glu	Phe	Ala	Ser		
	50					55					60						
Val	Ala	Ser	Cys	Asp	Ala	Ala	Val	Ala	Gln	Cys	Phe	Leu	Ala	Glu	Asn		
65				70					75					80			
Asp	Trp	Glu	Met	Glu	Arg	Ala	Leu	Asn	Ser	Tyr	Phe	Glu	Pro	Pro	Val		
				85				90					95				
Glu	Glu	Ser	Ala	Leu	Glu	Arg	Arg	Pro	Glu	Thr	Ile	Ser	Glu	Pro	Lys		
			100					105					110				
Thr	Tyr	Val	Asp	Leu	Thr	Asn	Glu	Glu	Thr	Thr	Asp	Ser	Thr	Thr	Ser		
		115				120						125					
Lys	Ile	Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Thr	Gln	Gln	Glu	Asn	Gly	Ser	Met	Phe		
	130					135					140						

```

Ser Leu Ile Thr Trp Asn Ile Asp Gly Leu Asp Leu Asn Asn Leu Ser
145                      150                      155                      160
Glu Arg Ala Arg Gly Val Cys Ser Tyr Leu Ala Leu Tyr Ser Pro Asp
                      165                      170                      175
Val Ile Phe Leu Gln Glu Val Ile Pro Pro Tyr Tyr Ser Tyr Leu Lys
                      180                      185                      190
Lys Arg Ser Ser Asn Tyr Glu Ile Ile Thr Gly His Glu Glu Gly Tyr
                      195                      200                      205
Phe Thr Ala Ile Met Leu Lys Lys Ser Arg Val Lys Leu Lys Ser Gln
                      210                      215                      220
Glu Ile Ile Pro Phe Pro Ser Thr Lys Met Met Arg Asn Leu Leu Cys
225                      230                      235                      240
Val His Val Asn Val Ser Gly Asn Glu Leu Cys Leu Met Thr Ser His
                      245                      250                      255
Leu Glu Ser Thr Arg Gly His Ala Ala Glu Arg Met Asn Gln Leu Lys
                      260                      265                      270
Met Val Leu Lys Lys Met Gln Glu Ala Pro Glu Ser Ala Thr Val Ile
                      275                      280                      285
Phe Ala Gly Asp Thr Asn Leu Arg Asp Arg Glu Val Thr Arg Cys Gly
                      290                      295                      300
Gly Leu Pro Asn Asn Ile Val Asp Val Trp Glu Phe Leu Gly Lys Pro
305                      310                      315                      320
Lys His Cys Gln Tyr Thr Trp Asp Thr Gln Met Asn Ser Asn Leu Gly
                      325                      330                      335
Ile Thr Ala Ala Cys Lys Leu Arg Phe Asp Arg Ile Phe Phe Arg Ala
                      340                      345                      350
Ala Ala Glu Glu Gly His Ile Ile Pro Arg Ser Leu Asp Leu Leu Gly
                      355                      360                      365
Leu Glu Lys Leu Asp Cys Gly Arg Phe Pro Ser Asp His Trp Gly Leu
                      370                      375                      380
Leu Cys Asn Leu Asp Ile Ile Leu
385                      390                      392

```

【0102】配列番号：3

配列の長さ：1522

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列

```

Met Ser Arg Asn Asp Lys Glu Pro Phe Phe Val Lys Phe Leu Lys Ser
1                      5                      10                      15
Ser Asp Asn Ser Lys Cys Phe Phe Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Glu
                      20                      25                      30
Phe Gln Ser Glu Glu Tyr Leu Gln Ile Ile Thr Glu Glu Glu Ala Leu
                      35                      40                      45
Lys Ile Lys Glu Asn Asp Arg Ser Leu Tyr Ile Cys Asp Pro Phe Ser
                      50                      55                      60
Gly Val Val Phe Asp His Leu Lys Lys Leu Gly Cys Arg Ile Val Gly
65                      70                      75                      80
Pro Gln Val Val Ile Phe Cys Met His His Gln Arg Cys Val Pro Arg
                      85                      90                      95
Ala Glu His Pro Val Tyr Asn Met Val Met Ser Asp Val Thr Ile Ser
                      100                      105                      110
Cys Thr Ser Leu Glu Lys Glu Lys Arg Glu Glu Val His Lys Tyr Val

```

			115					120					125				
Gln	Met	Met	Gly	Gly	Arg	Val	Tyr	Arg	Asp	Leu	Asn	Val	Ser	Val	Thr		
	130						135					140					
His	Leu	Ile	Ala	Gly	Glu	Val	Gly	Ser	Lys	Lys	Tyr	Leu	Val	Ala	Ala		
145					150					155					160		
Asn	Leu	Lys	Lys	Pro	Ile	Leu	Leu	Pro	Ser	Trp	Ile	Lys	Thr	Leu	Trp		
			165						170					175			
Glu	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Lys	Ile	Thr	Arg	Tyr	Thr	Asp	Ile	Asn	Met		
			180					185					190				
Glu	Asp	Phe	Lys	Cys	Pro	Ile	Phe	Leu	Gly	Cys	Ile	Ile	Cys	Val	Thr		
	195						200					205					
Gly	Leu	Cys	Gly	Leu	Asp	Arg	Lys	Glu	Val	Gln	Gln	Leu	Thr	Val	Lys		
	210					215					220						
His	Gly	Gly	Gln	Tyr	Met	Gly	Gln	Leu	Lys	Met	Asn	Glu	Cys	Thr	His		
225					230					235					240		
Leu	Ile	Val	Gln	Glu	Pro	Lys	Gly	Gln	Lys	Tyr	Glu	Cys	Ala	Lys	Arg		
				245					250					255			
Trp	Asn	Val	His	Cys	Val	Thr	Thr	Gln	Trp	Phe	Phe	Asp	Ser	Ile	Glu		
		260						265					270				
Lys	Gly	Phe	Cys	Gln	Asp	Glu	Ser	Ile	Tyr	Lys	Thr	Glu	Pro	Arg	Pro		
	275						280					285					
Glu	Ala	Lys	Thr	Met	Pro	Asn	Ser	Ser	Thr	Pro	Thr	Ser	Gln	Ile	Asn		
	290					295					300						
Thr	Ile	Asp	Ser	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Val	Ser	Asn	Ile	Ser	Asn	Ile		
305					310					315					320		
Asn	Ala	Ser	Cys	Val	Ser	Glu	Ser	Ile	Cys	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Lys		
			325						330					335			
Leu	Glu	Pro	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Val	Ser	Ala	Phe		
		340						345					350				
Gln	Ala	Pro	Glu	Asp	Leu	Leu	Asp	Gly	Cys	Arg	Ile	Tyr	Leu	Cys	Gly		
	355						360					365					
Phe	Ser	Gly	Arg	Lys	Leu	Asp	Lys	Leu	Arg	Arg	Leu	Ile	Asn	Ser	Gly		
	370					375					380						
Gly	Gly	Val	Arg	Phe	Asn	Gln	Leu	Asn	Glu	Asp	Val	Thr	His	Val	Ile		
385					390					395					400		
Val	Gly	Asp	Tyr	Asp	Asp	Glu	Leu	Lys	Gln	Phe	Trp	Asn	Lys	Ser	Ala		
			405						410					415			
His	Arg	Pro	His	Val	Val	Gly	Ala	Lys	Trp	Leu	Leu	Glu	Cys	Phe	Ser		
		420						425					430				
Lys	Gly	Tyr	Met	Leu	Ser	Glu	Glu	Pro	Tyr	Ile	His	Ala	Asn	Tyr	Gln		
	435						440					445					
Pro	Val	Glu	Ile	Pro	Val	Ser	His	Gln	Pro	Glu	Ser	Lys	Ala	Ala	Leu		
	450					455					460						
Leu	Lys	Lys	Lys	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Lys	Lys	Asp	Phe	Ala	Pro	Ser		
465					470					475					480		
Glu	Lys	His	Glu	Gln	Ala	Asp	Glu	Asp	Leu	Leu	Ser	Gln	Tyr	Glu	Asn		
			485					490						495			
Gly	Ser	Ser	Thr	Val	Val	Glu	Ala	Lys	Thr	Ser	Glu	Ala	Arg	Pro	Phe		
		500						505				510					
Asn	Asp	Ser	Thr	His	Ala	Glu	Pro	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	His	Ile	Ser		

		515					520					525				
Leu	Gln	Glu	Glu	Asn	Gln	Ser	Ser	Val	Ser	His	Cys	Val	Pro	Asp	Val	
	530						535				540					
Ser	Thr	Ile	Thr	Glu	Glu	Gly	Leu	Phe	Ser	Gln	Lys	Ser	Phe	Leu	Val	
545					550					555					560	
Leu	Gly	Phe	Ser	Asn	Glu	Asn	Glu	Ser	Asn	Ile	Ala	Asn	Ile	Ile	Lys	
				565					570					575		
Glu	Asn	Ala	Gly	Lys	Ile	Met	Ser	Leu	Leu	Ser	Arg	Thr	Val	Ala	Asp	
			580					585					590			
Tyr	Ala	Val	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Cys	Glu	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	
	595						600				605					
Glu	Val	Val	Thr	Asn	Thr	Trp	Leu	Val	Thr	Cys	Ile	Asp	Tyr	Gln	Thr	
	610					615					620					
Leu	Phe	Asp	Pro	Lys	Ser	Asn	Pro	Leu	Phe	Thr	Pro	Val	Pro	Val	Met	
625				630					635						640	
Thr	Gly	Met	Thr	Pro	Leu	Glu	Asp	Cys	Val	Ile	Ser	Phe	Ser	Gln	Cys	
				645					650					655		
Ala	Gly	Ala	Glu	Lys	Glu	Ser	Leu	Thr	Phe	Leu	Ala	Asn	Leu	Leu	Gly	
			660					665					670			
Ala	Ser	Val	Gln	Glu	Tyr	Phe	Val	Arg	Lys	Ser	Asn	Ala	Lys	Lys	Gly	
	675						680				685					
Met	Phe	Ala	Ser	Thr	His	Leu	Ile	Leu	Lys	Glu	Arg	Gly	Gly	Ser	Lys	
	690					695					700					
Tyr	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Trp	Asn	Leu	Pro	Ala	Val	Thr	Ile	Ala	Trp	
705				710						715					720	
Leu	Leu	Glu	Thr	Ala	Arg	Thr	Gly	Lys	Arg	Ala	Asp	Glu	Ser	His	Phe	
				725					730					735		
Leu	Ile	Glu	Asn	Ser	Thr	Lys	Glu	Glu	Arg	Ser	Leu	Glu	Thr	Glu	Ile	
			740					745					750			
Thr	Asn	Gly	Ile	Asn	Leu	Asn	Ser	Asp	Thr	Ala	Glu	His	Pro	Gly	Thr	
	755						760						765			
Arg	Leu	Gln	Thr	His	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Thr	Pro	Leu	Asp	Met	Asn	
	770					775					780					
Arg	Phe	Gln	Ser	Lys	Ala	Phe	Arg	Ala	Val	Val	Ser	Gln	His	Ala	Arg	
785				790						795					800	
Gln	Val	Ala	Ala	Ser	Pro	Ala	Val	Gly	Gln	Pro	Leu	Gln	Lys	Glu	Pro	
				805					810					815		
Ser	Leu	His	Leu	Asp	Thr	Pro	Ser	Lys	Phe	Leu	Ser	Lys	Asp	Lys	Leu	
			820					825					830			
Phe	Lys	Pro	Ser	Phe	Asp	Val	Lys	Asp	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Glu	Thr	
	835						840						845			
Pro	Gly	Arg	Pro	Ser	Gln	Gln	Lys	Arg	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Leu	Ser	
	850					855										

915	920	925
Ser Leu Gly Ala Asp Tyr Arg Trp Ser Phe Asp Glu Thr Val Thr His		
930	935	940
Phe Ile Tyr Gln Gly Arg Pro Asn Asp Thr Asn Arg Glu Tyr Lys Ser		
945	950	955
Val Lys Glu Arg Gly Val His Ile Val Ser Glu His Trp Leu Leu Asp		
965	970	975
Cys Ala Gln Glu Cys Lys His Leu Pro Glu Ser Leu Tyr Pro His Thr		
980	985	990
Tyr Asn Pro Lys Met Ser Leu Asp Ile Ser Ala Val Gln Asp Gly Arg		
995	1000	1005
Leu Cys Asn Ser Arg Leu Leu Ser Ala Val Ser Ser Thr Lys Asp Asp		
1010	1015	1020
Glu Pro Asp Pro Leu Ile Leu Glu Glu Asn Asp Val Asp Asn Met Ala		
1025	1030	1035
Thr Asn Asn Lys Glu Ser Ala Pro Ser Asn Gly Ser Gly Lys Asn Asp		
1045	1050	1055
Ser Lys Gly Val Leu Thr Gln Thr Leu Glu Met Arg Glu Asn Phe Gln		
1060	1065	1070
Lys Gln Leu Gln Glu Ile Met Ser Ala Thr Ser Ile Val Lys Pro Gln		
1075	1080	1085
Gly Gln Arg Thr Ser Leu Ser Arg Ser Gly Cys Asn Ser Ala Ser Ser		
1090	1095	1100
Thr Pro Asp Ser Thr Arg Ser Ala Arg Ser Gly Arg Ser Arg Val Leu		
1105	1110	1115
Glu Ala Leu Arg Gln Ser Arg Gln Thr Val Pro Asp Val Asn Thr Glu		
1125	1130	1135
Pro Ser Gln Asn Glu Gln Ile Ile Trp Asp Asp Pro Thr Ala Arg Glu		
1140	1145	1150
Glu Arg Ala Arg Leu Ala Ser Asn Leu Gln Trp Pro Ser Cys Pro Thr		
1155	1160	1165
Gln Tyr Ser Glu Leu Gln Val Asp Ile Gln Asn Leu Glu Asp Ser Pro		
1170	1175	1180
Phe Gln Lys Pro Leu His Asp Ser Glu Ile Ala Lys Gln Ala Val Cys		
1185	1190	1195
Asp Pro Gly Asn Ile Arg Val Thr Glu Ala Pro Lys His Pro Ile Ser		
1205	1210	1215
Glu Glu Leu Glu Thr Pro Ile Lys Asp Ser His Leu Ile Pro Thr Pro		
1220	1225	1230
Gln Ala Pro Ser Ile Ala Phe Pro Leu Ala Asn Pro Pro Val Ala Pro		
1235	1240	1245
His Pro Arg Glu Lys Ile Ile Thr Ile Glu Glu Thr His Glu Glu Leu		
1250	1255	1260
Lys Lys Gln Tyr Ile Phe Gln Leu Ser Ser Leu Asn Pro Gln Glu Arg		
1265	1270	1275
Ile Asp Tyr Cys His Leu Ile Glu Lys Leu Gly Gly Leu Val Ile Glu		
1285	1290	1295
Lys Gln Cys Phe Asp Pro Thr Cys Thr His Ile Val Val Gly His Pro		
1300	1305	1310
Leu Arg Asn Glu Lys Tyr Leu Ala Ser Val Ala Ala Gly Lys Trp Val		

1315	1320	1325
Leu His Arg Ser Tyr Leu Glu Ala Cys Arg Thr	Ala Gly His Phe Val	
1330	1335	1340
Gln Glu Glu Asp Tyr Glu Trp Gly Ser Ser Ser	Ile Leu Asp Val Leu	
1345	1350	1355
Thr Gly Ile Asn Val Gln Gln Arg Arg Leu Ala Leu	Ala Ala Met Arg	
	1365	1370
Trp Arg Lys Lys Ile Gln Gln Arg Gln Glu Ser Gly	Ile Val Glu Gly	175
	1380	1385
Ala Phe Ser Gly Trp Lys Val Ile Leu His Val Asp	Gln Ser Arg Glu	1390
	1395	1400
Ala Gly Phe Lys Arg Leu Leu Gln Ser Gly Gly Ala	Lys Val Leu Pro	1405
	1410	1415
Gly His Ser Val Pro Leu Phe Lys Glu Ala Thr His	Leu Phe Ser Asp	
1425	1430	1435
Leu Asn Lys Leu Lys Pro Asp Asp Ser Gly Val Asn	Ile Ala Glu Ala	1440
	1445	1450
Ala Ala Gln Asn Val Tyr Cys Leu Arg Thr Glu Tyr	Ile Ala Asp Tyr	
	1460	1465
Leu Met Gln Glu Ser Pro Pro His Val Glu Asn Tyr	Cys Leu Pro Glu	1470
	1475	1480
Ala Ile Ser Phe Ile Gln Asn Asn Lys Glu Leu Gly	Thr Gly Leu Ser	1485
	1490	1495
Gln Lys Arg Lys Ala Pro Thr Glu Lys Asn Lys Ile	Lys Arg Pro Arg	1500
1505	1510	1515
Val His		1520
	1522	

【0103】配列番号：4

配列の長さ：2379

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

CTTTCCCAAA ACTCTCTCAA AATTGCGAGC CTTGGTCATG GCCTTTATCA CCTCCCGCAG	60
AGACTGAGTC ATGCTGGTCA TCGTGACGG TTTTCCAGCC TTTGGGCTTT GCGCAAGAAC	120
GAAGTTCGGA AGAGCTGGAA AGTCCAGAAG TTAGTGAAAG AAGGACACAA AGGGCGAAGA	180
GCCCGCACCC TTCTCCGCCC CTAGGAGCGC AAGAGGCCGG GAGTCAGGCG AGCTGGCAGC	240
CCCGGTGGTC CGCGATTTGC TCACTGACTT TCCTCGCACC CTTGTGACGA AGCGCGCATG	300
CGCGCTTCGC ACCCACC GCC CCGGCGGCTC CCTTGCGGCG CAGCTGCACC AGTTTTCGA	360
GAGCGGAGCG CATTTCCCCG CCGGGCGGTT G ATG CGG GAG CGC CAT GAC ACA	412
GGC GCC TGC GCA GAG CCG CGC GTT GGC CTC CTG TTC CGC TTA AAG GGG	460
CGG TGC AGA GGC GGC AGG AAG ATG GAG TTG GGG AGT TGC CTG GAG GGC	508
GGG AGG GAG GCG GCG GAG GAA GAG GGC GAG CCT GAG GTG AAA AAG CGG	556
CGA CTT CTG TGT GTG GAG TTT GCC TCG GTC GCA AGC TGC GAT GCC GCA	604
GTG GCT CAG TGC TTC CTG GCC GAG AAC GAC TGG GAG ATG GAA AGG GCT	652
CTG AAC TCC TAC TTC GAG CCT CCG GTG GAG GAG AGC GCC TTG GAA CGC	700
CGA CCT GAA ACC ATC TCT GAG CCC AAG ACC TAT GTT GAC CTA ACC AAT	748
GAA GAA ACA ACT GAT TCC ACC ACT TCT AAA ATC AGC CCA TCT GAA GAT	796
ACT CAG CAA GAA AAT GGC AGC ATG TTC TCT CTC ATT ACC TGG AAT ATT	844
GAT GGA TTA GAT CTA AAC AAT CTG TCA GAG AGG GCT CGA GGG GTG TGT	892
TCC TAC TTA GCT TTG TAC AGC CCA GAT GTG ATA TTT CTA CAG GAA GTT	940
ATT CCC CCA TAT TAT AGC TAC CTA AAG AAG AGA TCA AGT AAT TAT GAG	988

ATT ATT ACA GGT CAT GAA GAA GGA TAT TTC ACA GCT ATA ATG TTG AAG 1036
 AAA TCA AGA GTG AAA TTA AAA AGC CAA GAG ATT ATT CCT TTT CCA AGT 1084
 ACC AAA ATG ATG AGA AAC CTT TTA TGT GTG CAT GTG AAT GTG TCA GGA 1132
 AAT GAG CTT TGC CTT ATG ACA TCC CAT TTG GAG AGC ACC AGA GGG CAT 1180
 GCT GCG GAA CGA ATG AAT CAG TTA AAA ATG GTT TTA AAG AAA ATG CAA 1228
 GAG GCT CCA GAG TCA GCT ACA GTT ATA TTT GCA GGA GAT ACA AAT CTA 1276
 AGG GAT CGA GAG GTT ACC AGA TGT GGT GGT TTA CCC AAC AAC ATT GTG 1324
 GAT GTC TGG GAG TTT TTG GGC AAA CCT AAA CAT TGC CAG TAT ACA TGG 1372
 GAT ACA CAA ATG AAC TCT AAT CTT GGA ATA ACT GCT GCT TGT AAA CTT 1420
 CGT TTT GAT CGA ATA TTT TTC AGA GCA GCA GCA GAA GAG GGA CAC ATT 1468
 ATT CCC CGA AGT TTG GAC CTT CTT GGA TTA GAA AAA CTG GAC TGT GGT 1516
 AGA TTT CCT AGT GAT CAC TGG GGT CTT CTG TGC AAC TTA GAT ATA ATA 1564
 TTG TAA AATGCTTTTC AAGTGTGGGT TTTGCCCTGA TTGTTGCAAA TACAATTTCC 1620
 ACCTTCTGGA AAGGTAGGT TGCTGTGGAG GAAATAATGT ACTAGATCAT TGTCACAGAA 1680
 AAACCAACTA TGATTTATGG TTGTGTTTTT AGAATTCAAC ATTAAAGATT AATGTTTATT 1740
 TAAACGAACA CATTCCTGCA TTCAGGATGT GAGGCCATTT AATAAAAAGG GCACAAAGCC 1800
 TGTCAGAGTT TTCAACGGTG CTTACAGCTG CCAGCTGGAT TCCAAACAGG TACCCCATTTG 1860
 TCTCTGAGCT AATGTTTATA TTTTTCATT CAGGCACCGA AATAGTTAAT ATTTAAAATA 1920
 AGTCTTCAAA AGAAAACATA AGAGATTATT GAGTTCCTGG GACTGGATCC TTTATTTTCAT 1980
 AAGTTCAGAT CATCTTAAAT GAAAATGCCA TGATTATCTG CAGTTAAGTA GATGACAGCT 2040
 ATTCTACATC AGACTTGATT TTTGTCAGCT AATTACATAA TTGGTAAGCT ATAATTGAAA 2100
 CCTTATGGCT TAAAATTCCT TAACTCCTTT TTGATTCATG TTTGTAGTCA TGTGTCAAC 2160
 AGAGGCAAAG TTAAGCTTGA TGATGGTTAA AATCGGTTTG ATAGCACCAT GGGACATTTT 2220
 TCTAACAAAA ATAAATGCAT GAAGAGACAT AGCCTTTTAG TTTTGCTAAT TGTGAAATGG 2280
 TCTCCGTTTC AATTCGAACT ACTACCAATT TTAGCCAAAC TATCGTGGTA CCCTGTAAAA 2340
 AGATTGTTTT TATTTACGTA CTTCTCTGTA TCGGAAAATC AAAACGATTA AACTTTACC 2280
 AAATGCTTTA CAGGAAGTAA ATGCAAATTA CTTTAAAGTG TGCTTTAAAG AAAAATATTT 2340
 TCCCCACAGG AGAAATTTAA ATAAAGAATT TTATTTGTT 2379

【0104】配列番号：5

配列の長さ：5256

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

CGACCCAGC CACCGCCCTG CGGCCAGCGC GTCCCCGAC TCGCCGCCCG GAGACCCCGA 60
 GGCTCCAACG AGTTCAGAA ATG TCC AGA AAT GAC AAA GAA CCG TTT TTT GTG 112
 AAG TTT TTA AAG TCT TCA GAC AAT TCC AAA TGT TTT TTT AAA GCT CTC 160
 GAG TCC ATA AAA GAA TTC CAA TCA GAA GAA TAT CTT CAG ATT ATT ACA 208
 GAA GAA GAG GCA TTG AAG ATA AAG GAG AAT GAT AGA TCA CTT TAT ATC 256
 TGC GAC CCT TTT AGT GGC GTT GTC TTT GAT CAC CTC AAA AAG CTT GGC 304
 TGC AGA ATT GTT GGT CCT CAA GTA GTC ATA TTT TGT ATG CAC CAC CAG 352
 CGA TGT GTC CCA AGA GCC GAA CAT CCA GTT TAT AAT ATG GTT ATG TCT 400
 GAT GTA ACC ATA TCT TGT ACA AGT CTG GAA AAA GAA AAA AGG GAA GAA 448
 GTT CAT AAA TAT GTA CAA ATG ATG GGC GGA CGA GTA TAC AGA GAC CTT 496
 AAT GTA TCA GTA ACT CAC CTT ATT GCA GGA GAA GTT GGT AGC AAA AAA 544
 TAT TTA GTT GCT GCA AAC CTG AAG AAA CCT ATT TTG CTT CCC TCT TGG 592
 ATA AAA ACA CTT TGG GAG AAG TCA CAA GAG AAA AAA ATA ACT AGA TAT 640
 ACT GAT ATA AAC ATG GAA GAT TTC AAG TGT CCT ATT TTT CTT GGT TGC 688
 ATA ATC TGT GTG ACT GGC TTA TGT GGC TTA GAC AGG AAA GAA GTT CAG 736
 CAA CTC ACA GTT AAG CAT GGA GGT CAA TAC ATG GGA CAA TTG AAA ATG 784
 AAT GAA TGT ACA CAC CTC ATT GTG CAA GAA CCA AAA GGT CAG AAG TAT 832
 GAG TGT GCC AAG AGA TGG AAT GTA CAC TGT GTG ACC ACA CAG TGG TTT 880

TTT	GAC	AGT	ATT	GAG	AAA	GGT	TTT	TGT	CAG	GAT	GAA	TCC	ATA	TAC	AAG	928
ACA	GAA	CCT	AGA	CCA	GAA	GCA	AAG	ACT	ATG	CCC	AAT	TCT	TCA	ACT	CCT	976
ACC	AGC	CAG	ATC	AAC	ACA	ATT	GAT	AGT	CGT	ACT	CTT	TCA	GAT	GTC	AGC	1024
AAT	ATT	TCC	AAC	ATA	AAT	GCA	AGT	TGC	GTA	AGT	GAA	TCA	ATA	TGT	AAT	1072
TCA	CTT	AAC	AGC	AAA	CTG	GAG	CCT	ACA	CTT	GAA	AAT	CTA	GAA	AAT	CTG	1120
GAT	GTC	AGT	GCA	TTT	CAA	GCA	CCT	GAA	GAT	TTA	TTA	GAT	GGT	TGT	CGG	1168
ATA	TAT	CTT	TGC	GGT	TTT	AGT	GGC	AGA	AAG	CTA	GAT	AAA	CTG	AGA	AGA	1216
CTT	ATT	AAC	AGT	GGA	GGT	GGA	GTT	CGT	TTT	AAC	CAG	CTA	AAT	GAA	GAT	1264
GTA	ACT	CAT	GTT	ATT	GTG	GGA	GAT	TAT	GAT	GAT	GAA	TTG	AAG	CAG	TTT	1312
TGG	AAT	AAA	TCA	GCC	CAC	AGG	CCT	CAT	GTA	GTG	GGA	GCA	AAG	TGG	TTG	1360
CTA	GAG	TGT	TTC	AGT	AAA	GGT	TAT	ATG	CTT	TCT	GAA	GAA	CCA	TAT	ATC	1408
CAT	GCT	AAT	TAC	CAG	CCA	GTG	GAA	ATT	CCA	GTT	TCA	CAT	CAG	CCT	GAA	1456
AGT	AAA	GCA	GCT	CTT	TTA	AAA	AAG	AAG	AAC	AGC	AGC	TTC	TCT	AAG	AAA	1504
GAC	TTT	GCT	CCT	AGT	GAA	AAG	CAT	GAG	CAA	GCT	GAT	GAA	GAT	CTG	CTC	1552
TCT	CAA	TAT	GAA	AAT	GGT	AGC	TCC	ACA	GTA	GTT	GAG	GCT	AAG	ACG	TCT	1600
GAA	GCC	AGG	CCC	TTT	AAT	GAT	TCT	ACT	CAT	GCT	GAG	CCC	TTG	AAT	GAT	1648
TCT	ACT	CAC	ATT	TCT	TTG	CAA	GAA	GAA	AAC	CAG	TCT	TCT	GTC	AGT	CAT	1696
TGT	GTC	CCT	GAT	GTT	TCT	ACA	ATT	ACT	GAA	GAA	GGC	TTA	TTT	AGC	CAA	1744
AAG	AGT	TTC	CTT	GTT	TTG	GGT	TTT	AGT	AAT	GAA	AAT	GAA	TCT	AAC	ATC	1792
GCA	AAC	ATC	ATA	AAA	GAA	AAT	GCT	GGG	AAA	ATC	ATG	TCC	CTT	CTG	AGC	1840
AGA	ACT	GTT	GCG	GAT	TAT	GCT	GTG	GTT	CCT	CTG	CTG	GGG	TGT	GAA	GTG	1888
GAA	GCC	ACT	GTG	GGA	GAA	GTT	GTT	ACA	AAT	ACA	TGG	CTG	GTT	ACT	TGC	1936
ATA	GAC	TAT	CAG	ACT	TTG	TTT	GAT	CCA	AAG	TCG	AAT	CCT	CTC	TTC	ACA	1984
CCA	GTT	CCA	GTA	ATG	ACA	GGA	ATG	ACT	CCT	TTA	GAG	GAT	TGT	GTT	ATT	2032
TCA	TTT	AGC	CAG	TGT	GCT	GGA	GCA	GAA	AAA	GAG	TCT	TTA	ACA	TTC	CTA	2080
GCA	AAC	CTC	CTT	GGA	GCA	AGT	GTT	CAA	GAA	TAC	TTT	GTT	CGC	AAA	TCC	2128
AAT	GCA	AAG	AAA	GGC	ATG	TTT	GCC	AGT	ACT	CAT	CTT	ATA	CTG	AAA	GAA	2176
CGT	GGT	GGC	TCT	AAA	TAT	GAA	GCT	GCA	AAG	AAG	TGG	AAT	TTA	CCT	GCC	2224
GTT	ACT	ATA	GCT	TGG	CTG	TTG	GAG	ACT	GCT	AGA	ACG	GGA	AAG	AGA	GCA	2272
GAC	GAA	AGC	CAT	TTT	CTG	ATT	GAA	AAT	TCA	ACT	AAA	GAA	GAA	CGA	AGT	2320
TTG	GAA	ACA	GAA	ATA	ACA	AAT	GGA	ATC	AAT	CTA	AAT	TCA	GAT	ACT	GCA	2368
GAG	CAT	CCT	GGC	ACA	CGC	CTG	CAA	ACT	CAC	AGA	AAA	ACC	GTC	GTT	ACA	2416
CCT	TTA	GAT	ATG	AAC	CGC	TTT	CAG	AGT	AAA	GCT	TTC	CGT	GCT	GTG	GTC	2464
TCA	CAA	CAT	GCC	AGA	CAG	GTC	GCA	GCC	TCC	CCA	GCA	GTA	GGA	CAA	CCA	2512
CTT	CAG	AAG	GAG	CCC	TCG	TTA	CAC	CTG	GAT	ACA	CCA	TCA	AAA	TTC	CTG	2560
TCC	AAG	GAC	AAA	CTC	TTC	AAG	CCT	TCC	TTT	GAT	GTG	AAG	GAT	GCA	CTT	2608
GCA	GCC	TTG	GAA	ACT	CCA	GGA	CGT	CCC	AGC	CAA	CAG	AAA	AGG	AAA	CCG	2656
AGT	ACG	CCA	CTC	TCA	GAA	GTT	ATT	GTC	AAA	AAC	TTG	CAA	CTT	GCT	TTG	2704
GCA	AAT	AGC	TCT	CGA	AAT	GCT	GTC	GCT	CTT	TCT	GCC	AGC	CCT	CAA	CTG	2752
AAA	GAG	GCC	CAG	TCA	GAG	AAG	GAA	GAA	GCC	CCA	AAG	CCA	CTT	CAC	AAA	2800
GTA	GTG	GTA	TGT	GTT	AGT	AAA	AAA	CTC	AGT	AAG	AAG	CAG	AGT	GAA	CTA	2848
AAT	GGG	ATC	GCA	GCC	TCT	CTA	GGA	GCA	GAT	TAC	AGG	TGG	AGT	TTT	GAT	2896
GAA	ACA	GTG	ACT	CAT	TTC	ATC	TAT	CAA	GGG	CGG	CCA	AAT	GAC	ACT	AAT	2944
CGG	GAG	TAT	AAA	TCT	GTA	AAA	GAA	AGA	GGA	GTA	CAC	ATT	GTT	TCC	GAG	2992
CAC	TGG	CTT	TTA	GAT	TGT	GCC	CAA	GAG	TGT	AAA	CAT	CTT	CCT	GAA	TCT	3040
CTT	TAT	CCA	CAT	ACT	TAT	AAT	CCC	AAA	ATG	AGC	TTG	GAT	ATC	AGC	GCA	3088
GTG	CAA	GAT	GGC	CGG	CTC	TGT	AAT	AGT	CGA	CTA	CTC	TCA	GCT	GTG	TCT	3136
TCA	ACA	AAG	GAT	GAT	GAG	CCA	GAT	CCT	TTG	ATT	TTA	GAA	GAA	AAT	GAT	3184
GTA	GAC	AAT	ATG	GCC	ACC	AAT	AAT	AAA	GAG	TCA	GCA	CCA	TCA	AAT	GGA	3232
AGT	GGA	AAG	AAT	GAC	TCT	AAA	GGA	GTT	CTG	ACA	CAG	ACC	TTA	GAG	ATG	3280

AGA GAG AAC TTT CAG AAG CAG TTA CAG GAG ATA ATG TCT GCA ACA TCA 3328
 ATA GTG AAA CCC CAA GGG CAG AGG ACT TCC CTT TCA AGA AGT GGT TGT 3376
 AAC AGC GCA TCT TCA ACC CCT GAC AGC ACT CGC TCT GCT CGC AGT GGA 3424
 CGA AGT AGA GTC CTA GAG GCA CTG AGG CAG TCT CGT CAG ACA GTA CCT 3472
 GAT GTC AAC ACA GAG CCT TCC CAA AAT GAA CAG ATC ATT TGG GAT GAC 3520
 CCT ACA GCA AGG GAG GAG AGA GCA AGG CTT GCC AGC AAT TTG CAG TGG 3568
 CCT AGT TGT CCC ACA CAA TAC TCT GAG CTT CAG GTT GAC ATT CAA AAC 3616
 TTG GAG GAT TCT CCT TTT CAA AAG CCT TTA CAT GAT TCA GAA ATT GCT 3664
 AAA CAG GCT GTC TGT GAT CCT GGA AAC ATA CGT GTG ACT GAA GCT CCC 3712
 AAA CAC CCA ATC TCT GAA GAA CTG GAA ACT CCC ATA AAA GAC AGC CAC 3760
 CTG ATC CCT ACG CCT CAA GCC CCC AGT ATT GCC TTT CCA CTC GCC AAC 3808
 CCC CCT GTG GCT CCG CAC CCT AGA GAA AAG ATT ATA ACG ATA GAG GAG 3856
 ACT CAT GAA GAA TTA AAA AAA CAG TAC ATA TTT CAG TTA TCA TCT CTG 3904
 AAT CCT CAA GAA CGT ATT GAC TAT TGT CAT CTG ATT GAG AAA CTA GGT 3952
 GGA TTG GTG ATA GAA AAG CAG TGC TTT GAT CCC ACC TGT ACA CAC ATT 4000
 GTT GTG GGA CAT CCA CTT CGA AAC GAG AAG TAT TTA GCC TCA GTG GCA 4048
 GCT GGG AAG TGG GTG CTT CAT CGC TCC TAC CTT GAA GCC TGC AGG ACT 4096
 GCT GGA CAC TTC GTG CAG GAA GAA GAC TAT GAA TGG GGA AGT AGT TCC 4144
 ATA CTT GAT GTT TTG ACT GGA ATC AAT GTA CAG CAA CGA AGA CTA GCA 4192
 CTT GCA GCA ATG AGA TGG AGA AAA AAA ATC CAG CAA AGA CAA GAA TCT 4240
 GGC ATT GTT GAG GGA GCA TTT AGT GGG TGG AAG GTT ATT TTA CAT GTG 4288
 GAT CAG TCT CGA GAA GCA GGC TTC AAA CGC CTT CTT CAG TCA GGA GGA 4336
 GCA AAG GTG CTA CCT GGT CAT TCT GTA CCT TTA TTT AAA GAG GCC ACA 4384
 CAT CTT TTT TCT GAC TTG AAT AAA CTG AAA CCA GAT GAC TCG GGA GTT 4432
 AAT ATA GCA GAA GCT GCT GCC CAG AAC GTG TAC TGC TTG AGA ACA GAA 4480
 TAC ATT GCT GAT TAT CTC ATG CAG GAA TCA CCT CCT CAT GTA GAA AAT 4528
 TAC TGT CTA CCA GAA GCT ATT TCA TTT ATT CAG AAT AAT AAG GAA CTT 4576
 GGG ACT GGA TTA TCA CAA AAG AGG AAA GCT CCT ACA GAA AAA AAT AAA 4624
 ATC AAA CGA CCT AGA GTA CAC TAA TCGCATCTAC CCTTTAGTTA CCAAACATTA 4678
 AATGTTTTTA AAAATTGAAA GCCTGAATGT GACTGTGATA GATTTGGGTA GTAATTTAAA 4738
 GATGAGTACC TGAAGAATTC TGCTTCAGAG TATAATGATG ACCCTTCTTG AGTTTTGAAC 4798
 ACCTGAAATT GTAATCACTG AAATATTAAC TGTTTCTTAA TAAAAAGTTA CCTGAAATAA 4858
 CAACAAAATA CAACTCCTCA GCTAGCTTGC TGTTAAACCA CATTGAAGTC TGTTAAAAGA 4918
 TATTTATTTT TCTTGTAAT ATCTGAAGCT GTAGCTTAGT GGAAATTTTA GCAAGGTAAT 4978
 GGATTTTGCT TTAAAATGTC TGCCTTACAA ATTCATAACA ACAAGATTTG TCAGTCAGCA 5038
 TTTATTCATG TTTTCCCTGA TTTTATCTT CTCACCATTT TACCTCTTTT AACAGGAGCC 5098
 TGAGCACAAG GTTTAATGAG GAAGCTGGGG CTATAAATAT GTGTGTATAT ATGTATATGT 5158
 ATGTTTGTAC AAATCTCCAT GATGTTTGCC AAGTTTGAAT GCGCAAACT TGGAAAATGT 5218
 GACAATAAAG AATAAAAGTA GTAAC TCAAA TTAGTATT 5256

【0105】配列番号：6

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：479

配列の種類：ペプチド

配列

Asn	Met	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Thr	Lys	Glu	Lys	Val	Glu	Glu	Leu	Ile
1				5					10					15	
Lys	Gln	Arg	Asp	Ala	Lys	Gly	Arg	Glu	Val	Asn	Asp	Leu	Lys	Arg	Lys
			20					25				30			
Ser	Pro	Ser	Asp	Leu	Trp	Lys	Glu	Asp	Leu	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Glu
			35				40					45			
Leu	Asp	Lys	Val	Glu	Ser	Gln	Glu	Arg	Glu	Asp	Val	Leu	Ala	Gly	Met
			50				55					60			

Ser	Gly	Lys	Ala	Ile	Lys	Gly	Lys	Val	Gly	Lys	Pro	Lys	Val	Lys	Lys	65	70	75	80
Leu	Gln	Leu	Glu	Glu	Thr	Met	Pro	Ser	Pro	Tyr	Gly	Arg	Pro	Ile	Ile		85	90	95
Pro	Glu	Ile	Thr	Ala	Met	Lys	Ala	Asp	Ala	Ser	Lys	Lys	Leu	Leu	Lys	100	105	110	
Lys	Lys	Lys	Gly	Asp	Leu	Asp	Thr	Ala	Ala	Val	Lys	Val	Glu	Phe	Asp	115	120	125	
Glu	Glu	Phe	Ser	Gly	Ala	Pro	Val	Glu	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Ala	Leu	130	135	140	
Thr	Pro	Ser	Val	Pro	Ile	Asn	Lys	Gly	Pro	Lys	Pro	Lys	Arg	Glu	Lys	145	150	155	160
Lys	Glu	Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Lys	Thr	Pro	Thr	Ser	Ser	Gly	Lys	165	170	175	
Pro	Ser	Ala	Lys	Lys	Val	Lys	Lys	Arg	Asn	Pro	Trp	Ser	Asp	Asp	Glu	180	185	190	
Ser	Lys	Ser	Glu	Ser	Asp	Leu	Glu	Glu	Thr	Glu	Pro	Val	Val	Ile	Pro	195	200	205	
Arg	Asp	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Pro	Lys	Tyr	Thr	210	215	220	
Phe	Asp	Phe	Ser	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Ala	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	225	230	235	240
Asp	Asn	Asn	Asp	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Val	Lys	Ala	Ser	Pro	Ile	Thr	245	250	255	
Asn	Asp	Gly	Glu	Asp	Glu	Phe	Val	Pro	Ser	Asp	Gly	Leu	Asp	Lys	Asp	260	265	270	
Glu	Tyr	Thr	Phe	Ser	Pro	Gly	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Pro	Glu	Lys	Ser	275	280	285	
Leu	His	Asp	Lys	Lys	Ser	Gln	Asp	Phe	Gly	Asn	Leu	Phe	Ser	Phe	Pro	290	295	300	
Ser	Tyr	Ser	Gln	Lys	Ser	Glu	Asp	Asp	Ser	Ala	Lys	Phe	Asp	Ser	Asn	305	310	315	320
Glu	Glu	Asp	Ser	Ala	Ser	Val	Phe	Ser	Pro	Ser	Phe	Gly	Leu	Lys	Gln	325	330	335	
Thr	Asp	Lys	Val	Pro	Ser	Lys	Thr	Val	Ala	Ala	Lys	Lys	Gly	Lys	Pro	340	345	350	
Ser	Ser	Asp	Thr	Val	Pro	Lys	Pro	Lys	Arg	Ala	Pro	Lys	Gln	Lys	Lys	355	360	365	
Val	Val	Glu	Ala	Val	Asn	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Glu	Phe	Gly	Ile	Pro	370	375	380	
Lys	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Lys	Gly	Lys	Gly	Arg	Gly	Ala	Lys	Lys	Arg	385	390	395	400
Lys	Ala	Ser	Gly	Ser	Glu	Asn	Glu	Gly	Asp	Tyr	Asn	Pro	Gly	Arg	Lys	405	410	415	
Thr	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Lys	Lys	Pro	Lys	Lys	Thr	Ser	Phe	Asp	Gln	420	425	430	
Asp	Ser	Asp	Val	Asp	Ile	Phe	Pro	Ser	Asp	Phe	Pro	Thr	Glu	Pro	Pro	435	440	445	
Ser	Leu	Pro	Arg	Thr	Gly	Arg	Ala	Arg	Lys	Glu	Val	Lys	Tyr	Phe	Ala	450	455	460	

Glu Ser Asp Glu Glu Glu Asp Asp Val Asp Phe Ala Met Phe Asn
 465 470 475 479

【0106】配列番号：7
 配列の長さ：130

配列の型：アミノ酸
 配列の種類：ペプチド

配列
 Asn Met Ser Leu Val Ser Leu Thr Lys Glu Lys Val Glu Glu Leu Ile
 1 5 10 15
 Lys Gln Arg Asp Ala Lys Gly Arg Glu Val Asn Asp Leu Lys Arg Lys
 20 25 30
 Ser Pro Ser Asp Leu Trp Lys Glu Asp Leu Ala Ala Phe Val Glu Glu
 35 40 45
 Leu Asp Lys Val Glu Ser Gln Glu Arg Glu Asp Val Leu Ala Gly Met
 50 55 60
 Ser Gly Lys Ala Ile Lys Gly Lys Val Gly Lys Pro Lys Val Lys Lys
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Glu Glu Thr Met Pro Ser Pro Tyr Gly Arg Pro Ile Ile
 85 90 95
 Pro Glu Ile Thr Ala Met Lys Ala Asp Ala Ser Lys Lys Leu Leu Lys
 100 105 110
 Lys Lys Lys Gly Asp Leu Asp Thr Ala Ala Val Lys Val Glu Phe Asp
 115 120 125
 Glu Glu
 130

【0107】配列番号：8
 配列の長さ：32
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：
 配列

GGATCCGGTC AAAGAAAGAT TTGATTCAAA TG 32

【0108】配列番号：9

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

GATTTGTTGA AAAATGTTTG TGCTC 25

【0109】配列番号：10

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

GCTTCAAACG CCTTCTTCAG TCAGGAGGAGC 30

【0110】配列番号：11

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

TAATATAGCA GAAGCTGCTG CCCAGAACGT G 31

【0111】配列番号：12

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

AGGTGATCAA AGACAACGCC ACTAAAAGGG 30

【0112】配列番号：13

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

TTCTGAACTC GTTGGAGCCT CGGGGTCTCC 30

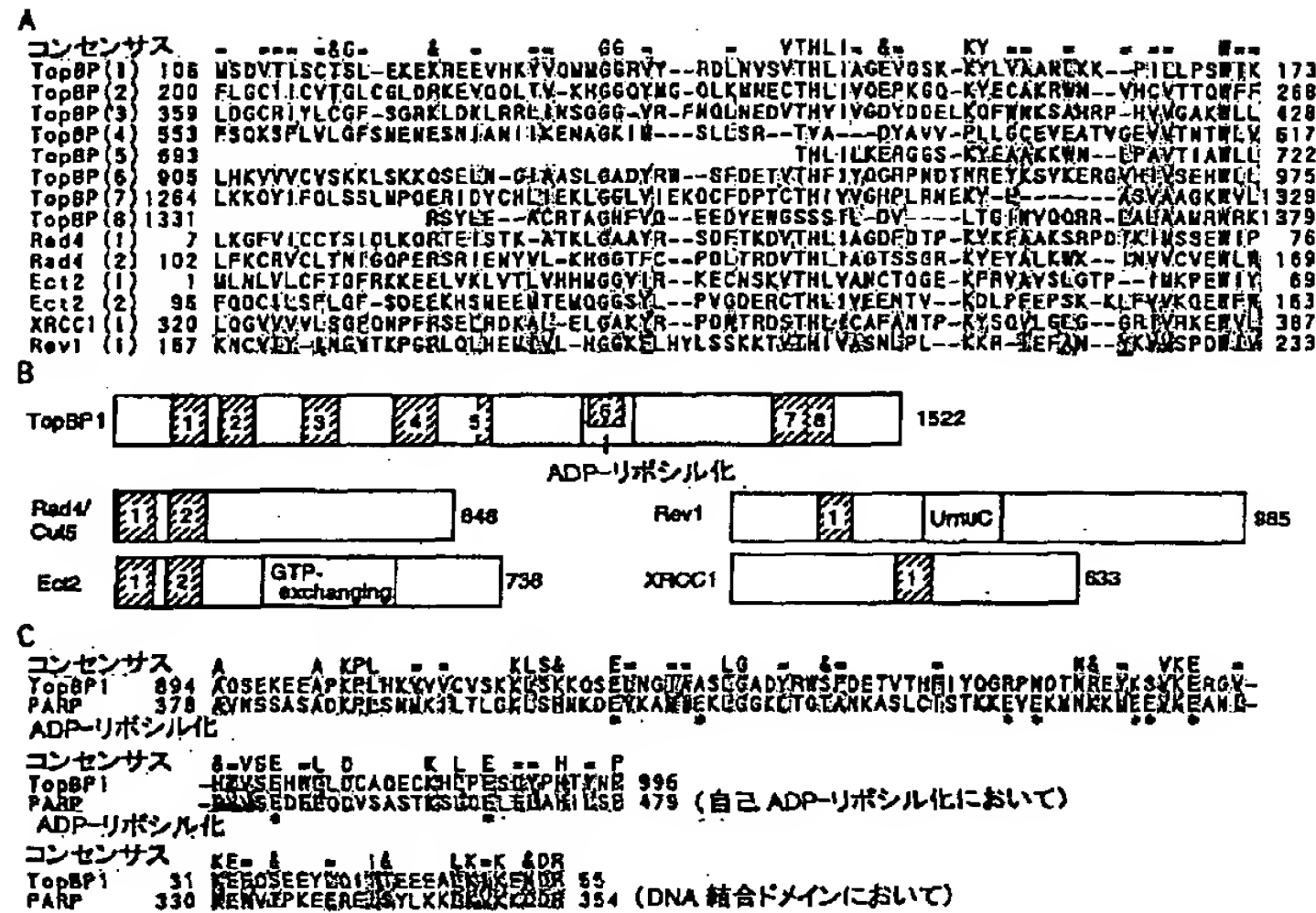
【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトトポイソメラーゼIIβ、TopBP1およびTopBP2の構造を模式的に示す図である。

【図2】TopBP2とNocturnin、DNA末端タンパク質の相同性を示す図である。

【図3】TopBP2とβ-アクチンの組織分布を示すノーザ

【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成9年9月25日

【手続補正1】

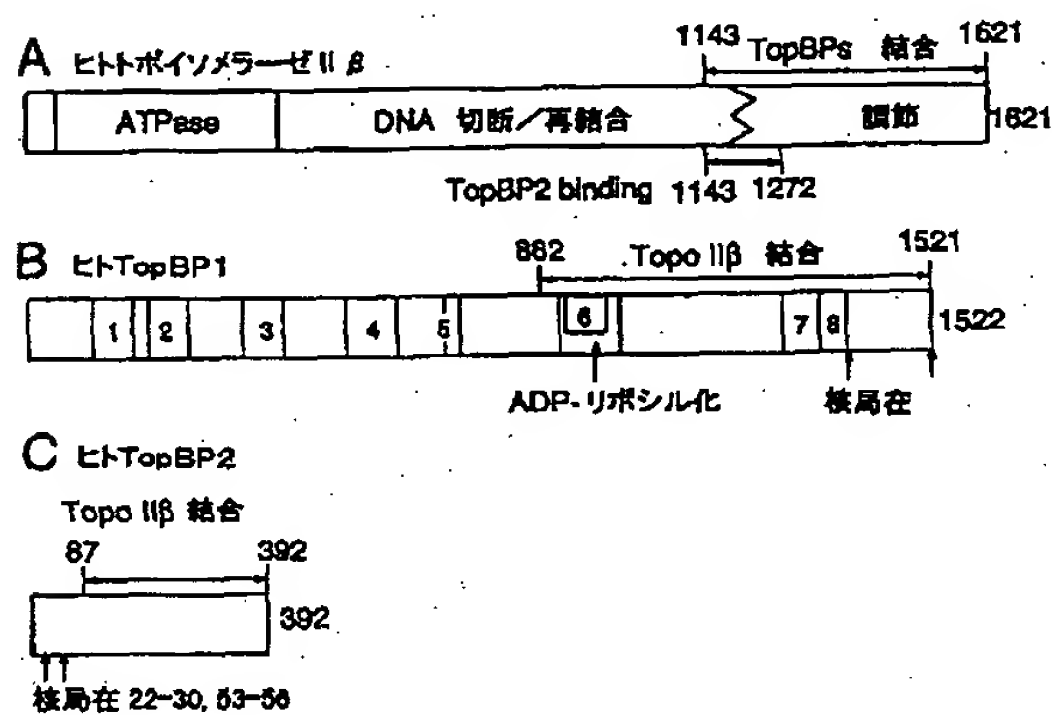
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】



【図2】

A ノクツニン(Nocturnin)

43% 同一 60% 類似

TopBP2 : 181 ERARGVCSYLALYSPOVIFLOEV 183
ER : YPDV: LQEV

Nocturnin: 131 ERKYLILEILMYOPDVLQOEV 153

28% 同一 48% 類似

TopBP2 : 248 SQNELQATSHLESTAGHAERUNQKYLKQKQAPESATV 287
LG LC:: :HL G R: Q :L: : : ATY

Nocturnin: 233 TGRQLCFAYTHLKARTGHEFFLAGGSOLLNLESITUGATV 274

40% 同一 65% 類似

TopBP2 : 367 LGLEKLDGRFPSSHHGLC 386
G :L :PSDH: L:C

Nocturnin: 357 IGPRLPSFNPSSHLSLVC 376

B DNA末端タンパク質(Terminal)

32% 同一 47% 類似

TopBP2 : 20 FLKGRGGRGIMELGSCLEGGREAEDEGPEVKKRLLCVFASVASC 68
R: GR R R : : R:A EGE EV RL: : : C

Terminal: 161 RUGGRGRLPHNSAAAAIDARDAGQEGGEVPERLMQDYKDLPRC 209

18% 同一 34% 類似

TopBP2 : 94 PPVEESALERRPETISEPKTYVLTMEETDSTTSKISPSQEDTQENGSMFLITWINDG 153
PP EE E I E E D: I E: : : : D

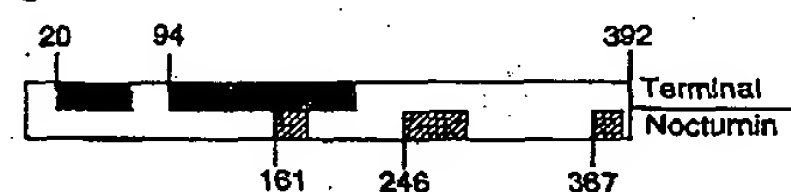
Terminal: 378 PPEEESALMEEEIEEESAPVAFEPYDTYAEILILEELTYSAPNSOFFNAYDF 437

TopBP2 : 154 LQNLSEARGVCSYLALYSPOVIFLOEVIPPYYSYLQGRSSNYEITGHEGYETAII 213
: : F: E : : YL R NY: : H E : : :

Terminal: 438 YEAMERLEALGDIESTURRWYFFVASHATTUNYLFQRLNRYAFARHVELNLAQV 497

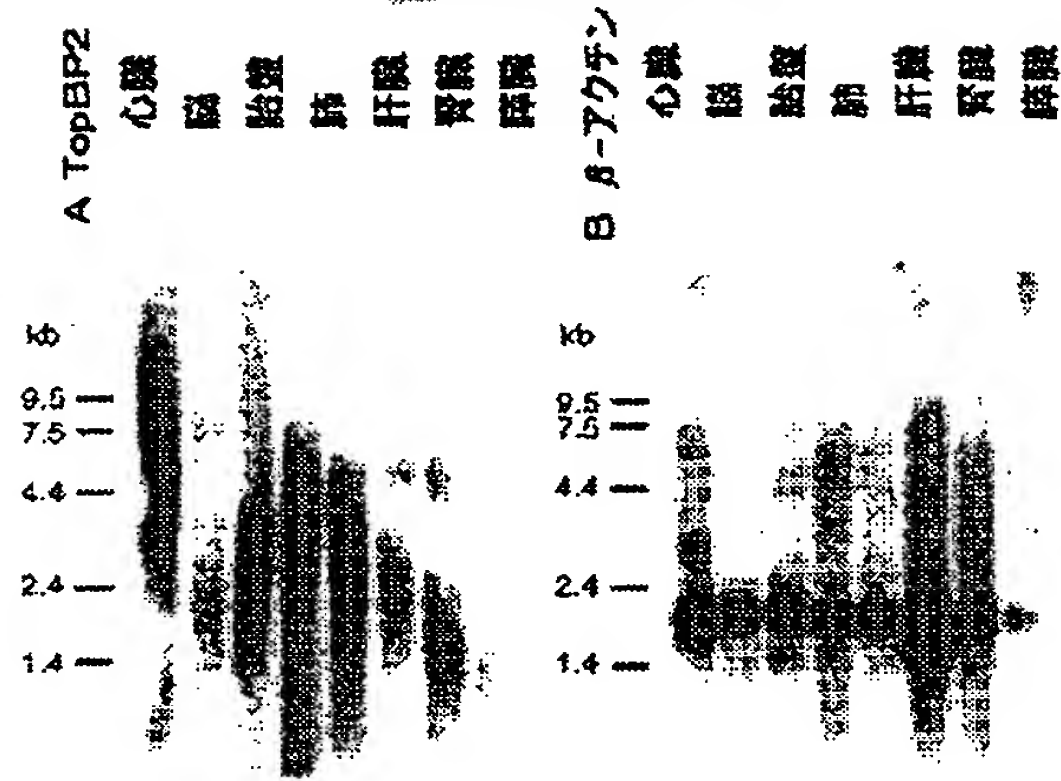
TopBP2 : 214 LK 215

Terminal: 498 MR 499

C TopBP2

【図3】

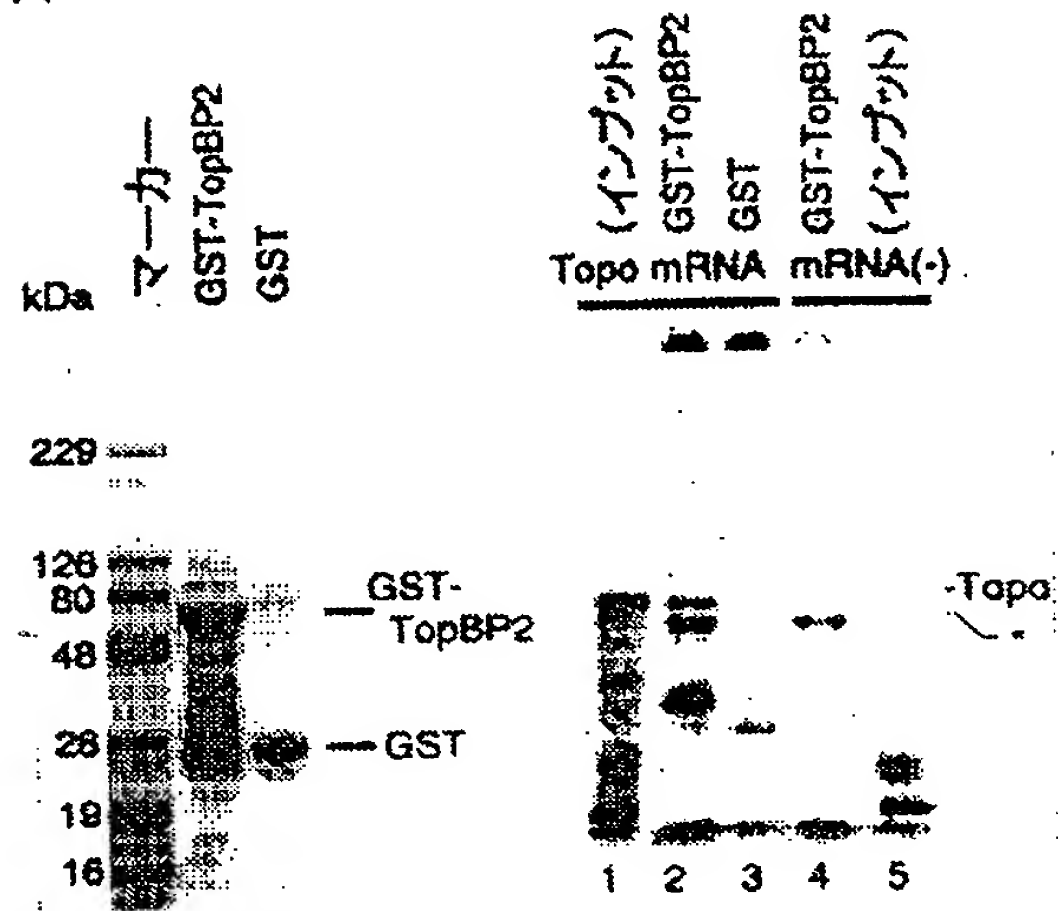
図面代用写真



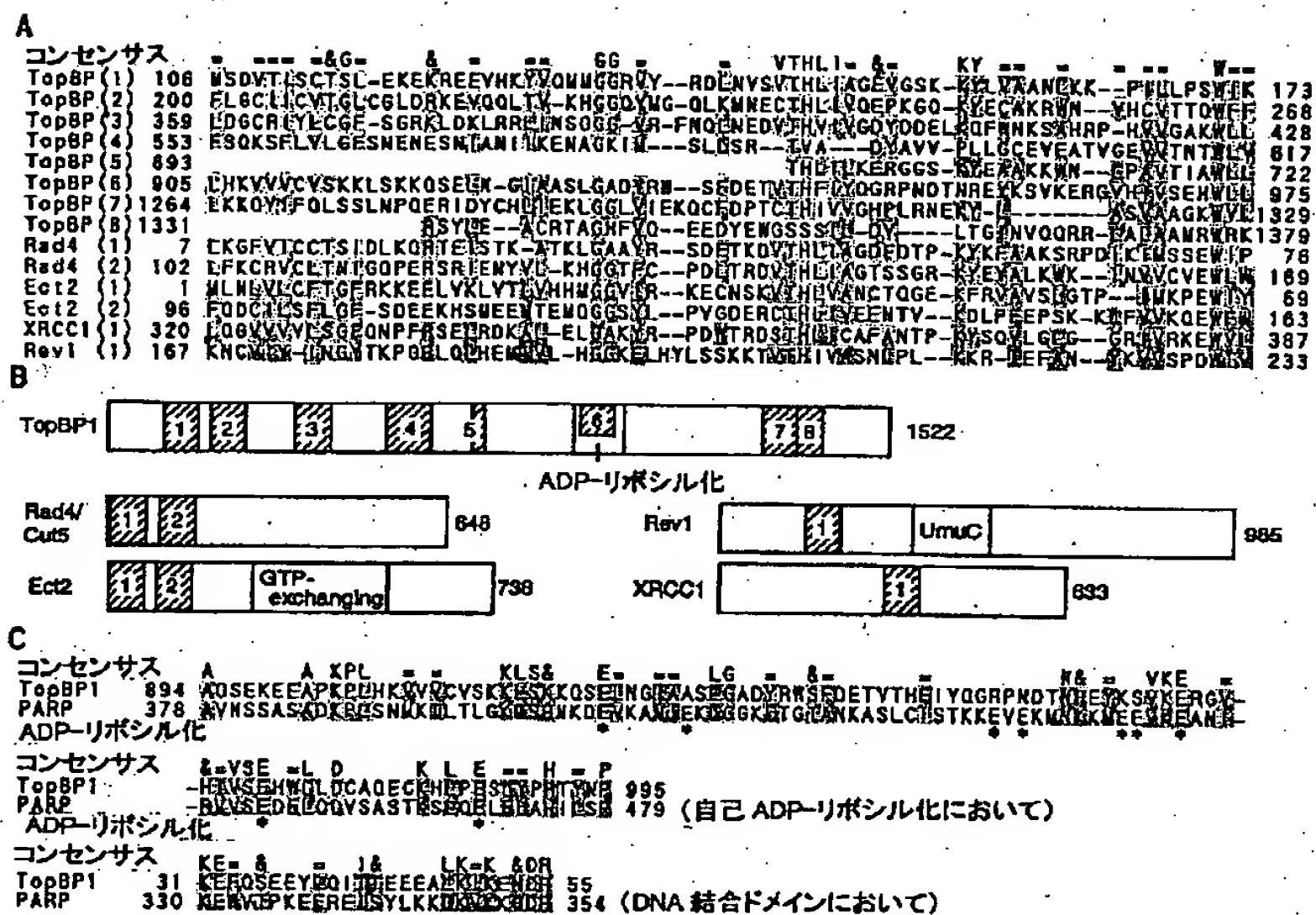
【図4】

図面代用写真

A クマシーブルー B [35 S]メチオニン

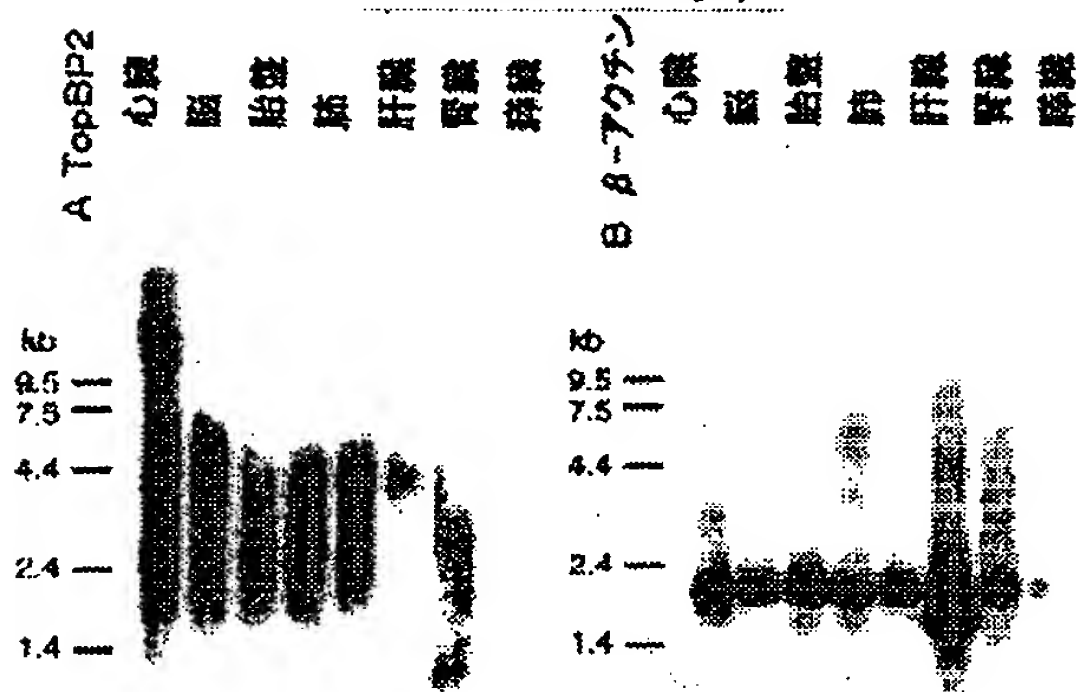


【図5】



【図6】

図面代用写真



【図7】

図面代用写真

A クマシーブルー

B [³⁵S]メチオニン